

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IVI CRISTINA RUBIM DUARTE LAGE

**ANÁLISE SEMINAL: VARIABILIDADE DA CONCENTRAÇÃO,
MOTILIDADE E MORFOLOGIA DE ESPERMATOZOIDES COM O
EMPREGO DA METODOLOGIA PRECONIZADA PELA
ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE**

CURITIBA

2013

IVI CRISTINA RUBIM DUARTE LAGE

ANÁLISE SEMINAL: VARIABILIDADE DA CONCENTRAÇÃO, MOTILIDADE E
MORFOLOGIA DE ESPERMATOZOIDES COM O EMPREGO DA METODOLOGIA
PRECONIZADA PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Suely Soares
Leonart

Co-Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo José do
Nascimento

CURITIBA

2013

TERMO DE APROVAÇÃO


IVI CRISTINA RUBIM DUARTE LAGE

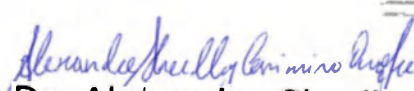
**Título: ANÁLISE SEMINAL: VARIABILIDADE DA
CONCENTRAÇÃO, MOTILIDADE E MORFOLOGIA DE
ESPERMATÓZOÍDES COM O EMPREGO DA METODOLOGIA
PRECONIZADA PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.


Prof.ª Dra. Maria Suely Soares Leonart
Orientadora


Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento
Co-orientador – Universidade Federal do Paraná


Prof.ª Dra. Aline Borsato Hauser
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre
Universidade Federal de Santa Catarina

Curitiba, 28 de março de 2013.

Ao Pedro, meu filho, meu grande amor.

Ao Vinícius, meu marido, meu companheiro.

Ao meu pai, Izary e à minha mãe, Isaly, que me ensinaram tudo o que sou.

Ao Ivan, meu irmão, meu eterno amigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por estar sempre presente em minha vida, me protegendo e abençoando a cada passo.

À minha orientadora, professora Maria Suely Soares Leonart, obrigada por me orientar mais uma vez, por sua amizade e dedicação.

Ao meu co-orientador, professor Aguinaldo José do Nascimento, sempre disposto a ajudar e o grande responsável pelas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Lídio Jair Ribas Centa, pela parceria e disponibilização da Clínica Androlab, sem a qual este trabalho não teria se realizado.

Às farmacêuticas do laboratório da Androlab, Sandra Mara Stockler, Adriane Trovão Soares Pereira e Karina Fronza Marfurte, pela disponibilidade para o treinamento das técnicas e no suporte para a realização dos experimentos deste trabalho.

A toda a equipe da Androlab pelo carinho com que sempre me recebeu.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de estar aqui, desenvolvendo este projeto.

À Irene Ermelino dos Santos, técnica do Laboratório de Citologia Clínica da UFPR, que se tornou uma amiga. Sem ela, as horas no laboratório de citologia seriam mais difíceis. Obrigada pelas lâminas mais bonitas do meu conjunto.

Ao Thiago Beltrami Dias Batista pela imensa ajuda com as fotografias.

À Tiffany Chang pelos desenhos incríveis criados especialmente para mim.

Aos amigos, pelos momentos divertidos que vivenciamos. Em especial à Cibelle Dallagassa, obrigada pelo companheirismo nessa caminhada, que já vem desde a graduação, e que espero que se estenda por muitos anos mais.

A toda minha família por sempre ter me apoiado.

Aos meus pais e ao meu irmão, por serem fontes de inspiração, não só por seus feitos, mas por sua dedicação e seu amor. Eu os amo muito.

Ao meu marido Vinícius, por me acompanhar e apoiar em todos os momentos.

E agradeço especialmente ao meu filho, que mesmo em sua inocência, estava ao meu lado, incentivando e colaborando, até quando eu não podia brincar para poder escrever.

“Os nossos pais ensinam-nos amor, riso e também a andar. Mas quando abrimos um livro, descobrimos que temos asas.”

Helen Hayes

RESUMO

O espermograma é o teste de escolha na investigação da infertilidade conjugal por ser não invasivo e de fácil execução, mas ainda há muitas variações em relação à metodologia empregada para as análises. Este trabalho tem como objetivo avaliar a variabilidade dos resultados das análises de motilidade, concentração e morfologia no exame do líquido seminal, de acordo com o Manual da Organização Mundial da Saúde (OMS), *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, 5ª edição. Foram analisadas amostras de sêmen de 37 pacientes que procuraram a Clínica Androlab Reprodução Humana, Curitiba-PR, no período de março a novembro de 2012, com 2 a 6 replicações por amostra. Calculou-se os valores médios, erros padrão da média e coeficientes de variação, a título de análise da variabilidade das medidas. Todas as análises realizadas apresentaram boa reprodutibilidade e ficaram dentro dos intervalos de confiança de 95 % propostos pelo Manual da OMS, com coeficientes de variação médios de 11,6 %, 13,3 % e 8,8 %, em replicações de análises de motilidade progressiva, concentração em câmara de Neubauer e morfologia normal de espermatozoides, respectivamente. Estes métodos de análise apresentam subjetividade em vários aspectos devido a sua natureza. Entretanto, ao seguir as recomendações preconizadas no Manual da OMS, é possível reduzir a variabilidade intra e interlaboratorial. A partir das recomendações do Manual da OMS para análises seminais, da variabilidade em amostras de líquido seminal analisadas neste trabalho e em valores de referência para o espermograma adotados em laboratórios de análises clínicas, foi possível estabelecer um roteiro de Procedimentos Operacionais Padrão para as determinações do Espermograma.

Palavras-chave: Análise do sêmen. Motilidade espermática. Contagem de espermatozoides. Morfologia.

ABSTRACT

Semen analysis is the test of choice in the investigation of marital infertility as is a noninvasive and easy to perform test, although there are still many variations in the methodology used for the analyzes. The aim of this study was to evaluate the variability of the results of analyzes of motility, concentration and morphology in seminal fluid examination, according to the Manual of the World Health Organization (WHO), WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edition. It was analyzed semen samples from 37 patients at Androlab Human Reproduction Clinic, Curitiba-PR, from March to November 2012, with 2 to 6 replicates per sample. It were calculated average, standard error of the mean and their variation coefficients, in order to analyze the measurements variability. All analyzes showed good reproducibility and they were within the 95 % confidence intervals proposed by WHO Manual, with average variation coefficients of 11,6 %, 13,3 % and 8,8 % for replication analyzes of progressive motility, concentration in a Neubauer chamber and normal morphology of spermatozoa respectively. There are subjectivity on these analyzes methods due to their nature. However, by following the recommendations in the WHO Manual, it is possible to reduce the intra- and inter-laboratory variability. Based on the recommendations of the WHO manual for semen analyzes, the variability in seminal fluid samples analyzed in this study, and the reference values for semen analysis adopted in clinical laboratories, it was possible to establish a guideline of Standard Operating Procedures for the determinations of semen.

Key-words: Semen analysis. Sperm motility. Sperm count. Morphology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA DO APARELHO REPRODUTOR MASCULINO.....	17
FIGURA 2 – VIA SEMINAL.....	18
FIGURA 3 – ESTRUTURA INTERNA DO TESTÍCULO.....	19
FIGURA 4 – ETAPAS DA ESPERMATOGÊNESE.....	24
FIGURA 5 – GRAU DE AGLUTINAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES E PARTES ENVOLVIDAS.....	32
FIGURA 6 – ESTRUTURA INTERNA DA CÂMARA DE NEUBAUER.....	34
FIGURA 7 – ESPERMATOZOIDES NORMAIS.....	37
FIGURA 8 – DEFEITOS DE CABEÇA DOS ESPERMATOZOIDES.....	39
FIGURA 9 – DEFEITOS DE PESCOÇO E PEÇA INTERMEDIÁRIA DOS ESPERMATOZOIDES.....	40
FIGURA 10 – DEFEITOS DE CAUDA DOS ESPERMATOZOIDES.....	42
FIGURA 11 – CAMPOS PARA CONTAGEM DA CÂMARA DE NEUBAUER IMPROVED.....	50
FIGURA 12 – CÂMARA DE MAKLER.....	51
FIGURA 13 – ESTRUTURA INTERNA DA CÂMARA DE MAKLER.....	51
FIGURA 14 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS VALORES RELATIVOS PARA MOTILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	53
FIGURA 15 – ERROS PADRÃO MÉDIOS DA ANÁLISE DE MOTILIDADE PROGRESSIVA DOS ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	55
FIGURA 16 – ERROS PADRÃO MÉDIOS DA ANÁLISE DE MOTILIDADE NÃO PROGRESSIVA DOS ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	56
FIGURA 17 – ERROS PADRÃO MÉDIOS DA ANÁLISE DE ESPERMATOZOIDES IMÓVEIS, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	56
FIGURA 18 – VALORES MÉDIOS PARA CONTAGENS DE ESPERMATOZOIDES EM CÂMARA DE NEUBAUER, REALIZADAS EM DIFERENTES DILUIÇÕES DO LÍQUIDO SEMINAL, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	59
FIGURA 19 – ERROS PADRÃO MÉDIOS DA ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	61
FIGURA 20 – ERROS PADRÃO MÉDIOS DA ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	62
FIGURA 21 – ERROS PADRÃO MÉDIOS DA ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	66
FIGURA 22 – VALORES MÉDIOS PARA CONTAGENS DE ESPERMATOZOIDES EM CÂMARA DE NEUBAUER, REALIZADAS EM DIFERENTES DILUIÇÕES DO LÍQUIDO SEMINAL E EM CÂMARA DE MAKLER, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	68
FIGURA 23 – VALORES MÉDIOS PARA CONTAGENS DE ESPERMATOZOIDES EM CÂMARA DE NEUBAUER, REALIZADAS EM DIFERENTES DILUIÇÕES DO	

LÍQUIDO SEMINAL E EM CÂMARA DE MAKLER, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	68
FIGURA 24 – FREQUÊNCIAS DA MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	69
FIGURA 25 – ERROS PADRÃO MÉDIOS DOS RESULTADOS DA ANÁLISE DE MORFOLOGIA EM RELAÇÃO À FORMA NORMAL DE ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	71
FIGURA 26 – ERROS PADRÃO MÉDIOS DOS RESULTADOS DA ANÁLISE DE MORFOLOGIA, EM RELAÇÃO ÀS FORMAS ANORMAIS DE ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.	71

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – ESQUEMA DAS CÉLULAS DA ESPERMATOGÊNESE APRESENTANDO SUAS DIMENSÕES E CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.....	26
QUADRO 2 – DIFERENÇAS ACEITÁVEIS ENTRE PORCENTAGENS DE DIFERENTES REPLICATAS.	33
QUADRO 3 – DILUIÇÃO NECESSÁRIA PARA CONTAGEM DE ESPERMATOZOIDES EM CÂMARA DE NEUBAUER E CAMPOS DE LEITURA.	34
QUADRO 4 – DIFERENÇAS ACEITÁVEIS ENTRE AS SOMAS DAS CONTAGENS DE ESPERMATOZOIDES DE DIFERENTES REPLICATAS.	35
QUADRO 5 – VALORES DE REFERÊNCIAS EMPREGADOS POR DIFERENTES LABORATÓRIOS.....	45
QUADRO 6: MARCHA DA COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU DE ACORDO COM KIT NEWPROV.	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO DOS VALORES RELATIVOS PARA MOTILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	53
TABELA 2 – MÉDIAS DAS PORCENTAGENS DE MOTILIDADE PROGRESSIVA, NÃO PROGRESSIVA E ESPERMATOZOIDES IMÓVEIS NO LÍQUIDO SEMINAL DE PACIENTES DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	54
TABELA 3 – MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO PARA MOTILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	57
TABELA 4 – MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO DOS VALORES RELATIVOS PARA CONCENTRAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	58
TABELA 5 – MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE ESPERMATOZOIDES CONTADAS EM CÂMARA DE NEUBAUER PARA O GRUPO 1***, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.	60
TABELA 6 – MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE ESPERMATOZOIDES CONTADAS EM CÂMARA DE NEUBAUER PARA O GRUPO 2***, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.	60
TABELA 7 – MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO PARA CONCENTRAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES CONTADOS EM CÂMARA DE NEUBAUER, NO GRUPO 1*, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	63
TABELA 8 – MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO PARA CONCENTRAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES CONTADOS EM CÂMARA DE NEUBAUER, NO GRUPO 2*, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	64
TABELA 9 – MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE ESPERMATOZOIDES CONTADAS EM CÂMARA DE MAKLER, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	65
TABELA 10 – MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO PARA CONCENTRAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES CONTADOS EM CÂMARA DE MAKLER, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.	67
TABELA 11 – MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO DOS VALORES RELATIVOS PARA MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	69
TABELA 12 – FREQUÊNCIAS DA MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	69

TABELA 13 – MÉDIAS DAS PORCENTAGENS DE FORMAS NORMAL E ANORMAIS DE ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	70
TABELA 14 – MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO DOS VALORES RELATIVOS PARA MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.....	72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	APARELHO REPRODUTOR MASCULINO	17
2.1.1	Testículos	18
2.1.1.1	Túbulos seminíferos	19
2.1.2	Epidídimo	20
2.1.3	Canal deferente	21
2.1.4	Vesículas seminais	21
2.1.5	Canais Ejaculadores	21
2.1.6	Próstata	22
2.1.7	Uretra	22
2.1.8	Glândulas Bulbouretrais ou de Cowper	23
2.1.9	Glândulas de Littre	23
2.1.10	Pênis	23
2.2	ESPERMATOGÊNESE	23
2.2.1	Espermatocitogênese	25
2.2.2	Meiose	25
2.2.3	Espermiogênese	25
2.3	INFERTILIDADE	27
2.4	Função espermática	28
2.5	Espermograma	28
2.5.1	Procedimentos pré-analíticos	29
2.5.2	Exames macroscópicos	29
2.5.2.1	Liquefação	29
2.5.2.2	Viscosidade	29
2.5.2.3	Aspecto	30
2.5.2.4	Volume	30
2.5.2.5	pH	30
2.5.3	Exames microscópicos	30
2.5.3.1	Aglutinação e agregação	31
2.5.3.2	Motilidade	32
2.5.3.3	Vitalidade	33
2.5.3.4	Concentração	34
2.5.3.5	Células redondas	35
2.5.3.6	Morfologia	36
2.6	ANÁLISE AUTOMATIZADA	42
2.7	CONTROLE DE QUALIDADE	43
2.8	DIFERENÇAS ENTRE VALORES DE REFERÊNCIA DO ESPERMOGRAMA EMPREGADOS POR DIVERSOS LABORATÓRIOS	44
3	OBJETIVOS	47
3.1	OBJETIVO GERAL	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1	MATERIAL	48
4.2	METODOLOGIA	48
4.2.1	Procedimentos pré-analíticos	48
4.2.2	Exame macroscópico	49

4.2.3 Exame microscópico.....	49
4.2.3.1 Motilidade.....	49
4.2.3.2 Concentração.....	50
4.2.3.3 Morfologia.....	52
5 RESULTADOS	53
5.1 MOTILIDADE	53
5.2 CONCENTRAÇÃO.....	58
5.2.1 Câmara de Neubauer.....	59
5.2.2 Câmara de Makler.....	65
5.2.3 Neubauer vs Makler.....	67
5.3 MORFOLOGIA.....	69
6 DISCUSSÃO.....	73
7 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	87
ANEXO II – PROTOCOLO CEP/SD.....	89
ANEXO III – NORMAS PARA COLETA DE ESPERMOGRAMA	90
ANEXO IV – Procedimentos Operacionais Padrão para o Espermograma de acordo com a Metodologia preconizada pela Organização Mundial da Saúde.....	91

1 INTRODUÇÃO

Para que possa ocorrer a fecundação, o espermatozoide precisa passar por um processo de maturação, que ocorre desde sua formação nos testículos, sendo conduzido através de todo o aparelho reprodutor masculino até sua chegada ao destino final, no trato genital feminino e, assim, acontecendo sua fusão com o óvulo, formando o ovo ou zigoto, dando origem ao feto.

A infertilidade masculina se deve a muitas causas que podem ser relacionadas à função testicular, à disfunção em algum estágio da espermatogênese ou a problemas no caminho do espermatozoide, até chegar ao óvulo. Com o desenvolvimento de novas técnicas de fertilização, o estudo da espermatogênese tem se mostrado relevante (KOSS; MELAMED, 2006).

Para a Organização Mundial da Saúde (OMS), a infertilidade conjugal é definida como a incapacidade de gerar um filho após dois anos de relações sexuais regulares sem o uso de contraceptivos, sendo considerada primária se o casal nunca teve filhos ou secundária, se já houve gravidez anterior (WALSH *et al.*, 2009; WHO, 2011).

A infertilidade atinge 8 a 15 % dos casais (WHO, 2011), sendo estimados 278 mil casos no Brasil, que ocorrem em algum período de sua idade fértil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Estima-se que 40 % dos casos de infertilidade estejam relacionados à esterilidade masculina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011), que pode ser causada por inúmeros fatores como: varicocele, infecções, cirurgias, vasectomia, doenças genéticas, malformações congênitas, causas endócrinas, traumas, medicamentos, drogas ilícitas e toxinas (JIMENEZ *et al.*, 2005).

Por ser um exame não invasivo e de fácil execução, o espermograma é o primeiro teste escolhido na investigação da infertilidade do casal (GILBERT; COOPER; GOLDSTEIN, 1992; ANDRADE-ROCHA, 2008).

Com a análise do sêmen, obtém-se informações importantes sobre a funcionalidade dos órgãos genitais masculinos e seus distúrbios (ANDRADE-ROCHA, 2003; ANDRADE-ROCHA, 2008; ELIASSON, 2010), que permitem decidir quais tratamentos clínicos e cirúrgicos serão necessários (VASQUEZ; ECHEVERRI, 2007).

Para tanto, é de fundamental importância que haja uma padronização da metodologia empregada, bem como estudos sobre a variabilidade para um mesmo analista ou entre analistas, intra ou interlaboratorial.

Os resultados liberados pelos laboratórios devem auxiliar os especialistas em reprodução humana a fornecer o diagnóstico mais provável (ANDRADE-ROCHA, 2008; ELIASSON, 2010). Para isto ser possível, deve-se dizer qual método foi utilizado e seu intervalo de referência (ELIASSON, 2010).

Em vários estudos, relata-se uma grande variabilidade de resultados na análise do espermograma (AUGER *et al.*, 2000; PALACIOS *et al.*, 2012; FILIMBERTI *et al.*, 2013). Este fato aponta para a necessidade de padronização e treinamento efetivos das técnicas a serem utilizadas (BJÖRND AHL *et al.*, 2002; IWAMOTO *et al.*, 2012).

As principais causas desta variabilidade de resultados e a probabilidade que os mesmos não sejam confiáveis, e ainda, de haver discrepâncias entre resultados de diferentes laboratórios, são: falta de padronização dos critérios utilizados para a avaliação; diferentes procedimentos realizados nos laboratórios; falta de informações a respeito dos pacientes; variações entre os procedimentos de coleta de amostras; e, treinamento insuficiente dos técnicos (AUGER *et al.*, 2000).

A variabilidade intra e interlaboratorial das determinações realizadas nos exames dos líquidos seminais levou à primeira edição do Manual da OMS em 1980 até culminar na sua 5ª edição de 2010, *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, (Manual da OMS para análise do sêmen humano, 5ª edição), que propõe uma metodologia padronizada de forma completa. Neste, as metodologias são descritas detalhadamente para permitir a uniformidade das análises realizadas, para que possa existir uniformidade na realização do exame, permitindo a comparação dos resultados (WHO, 2010).

Apesar de um espermograma normal não ser suficiente para garantir que o homem está apto à fertilização, pois não avalia suficientemente a função espermática (GILBERT; COOPER; GOLDSTEIN, 1992; SAMPLASKI *et al.*, 2010), fatores como a motilidade, concentração e morfologia estão profundamente relacionados à probabilidade de concepção (GUZICK *et al.*, 2001; SAMPLASKI *et al.*, 2010). A avaliação conjunta destas três análises estabelece resultados importantes para a distinção de homens férteis e não férteis (GUZICK *et al.*, 2001).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 APARELHO REPRODUTOR MASCULINO

A finalidade principal do aparelho reprodutor masculino (Figura 1) é a reprodução humana e por ele passa todo o líquido seminal (Figura 2). Este aparelho pode ser dividido em quatro conjuntos de órgãos, sendo eles: dois testículos; um conjunto de tubos para a passagem dos espermatozoides; glândulas acessórias; e o órgão da cópula (MORAES; ÉBOLI; PASQUALOTTO, 2007).

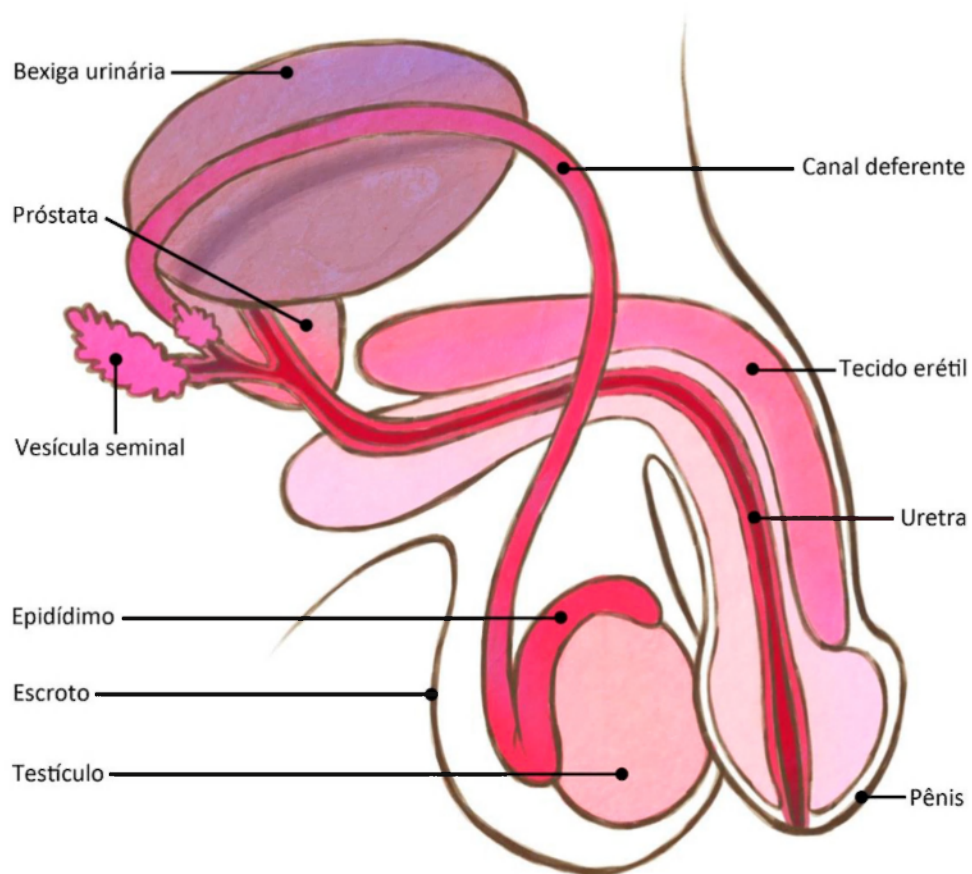


FIGURA 1 – ESTRUTURA DO APARELHO REPRODUTOR MASCULINO.
FONTE: A Autora (2013).
CRÉDITOS: Tiffany Chang.

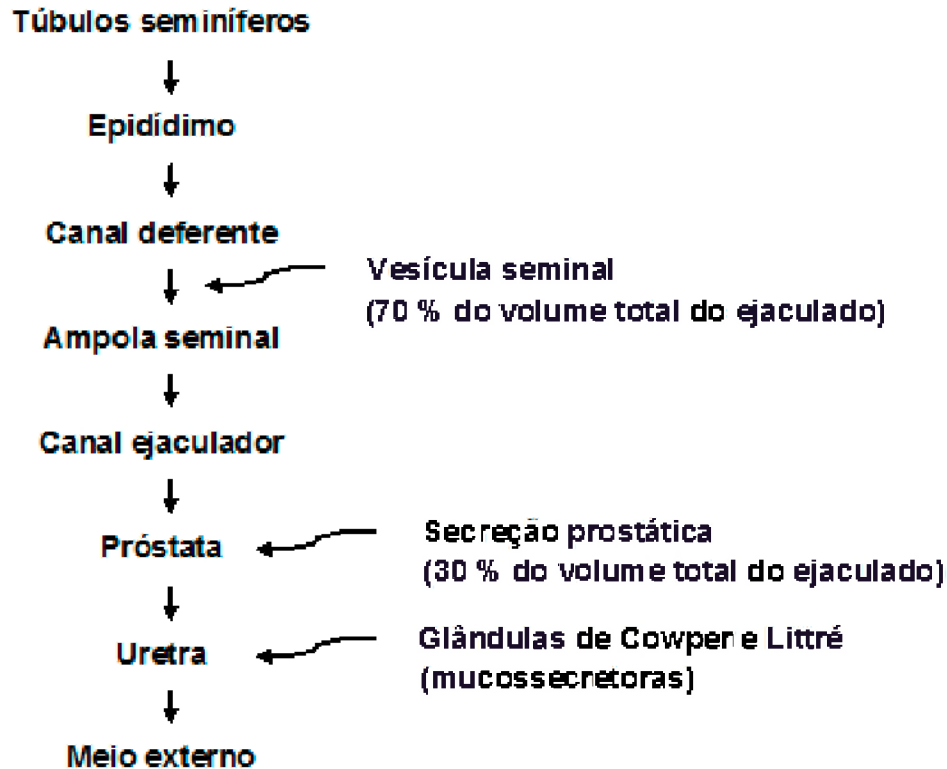


FIGURA 2 – VIA SEMINAL.
FONTE: A Autora (2013).

Nos testículos ocorre a espermatogênese e a produção da testosterona. Enquanto isso, o restante do trato reprodutor está relacionado ao desenvolvimento, função e transporte dos espermatozoides (BERNE; LEVY, 2009).

2.1.1 Testículos

Nos testículos, os espermatozoides são formados pelos túbulos seminíferos e a testosterona é secretada pelas células de Leydig (GUYTON, 2008). A localização dos testículos fora da cavidade abdominal, na bolsa escrotal, permite que a temperatura seja 2,2 °C abaixo da temperatura corporal, o que é fundamental para a espermatogênese (MORAES; ÉBOLI; PASQUALOTTO, 2007; BERNE; LEVY, 2009).

O formato dos testículos é ovoide, com diâmetro aproximado de 4,6 cm, espessura de 2,6 cm e peso de 21 g (JANINI; PEREIRA, 2001; MORAES; ÉBOLI; PASQUALOTTO, 2007). Cada testículo é envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo, denominada túnica albugínea, e é dividido por septos fibrosos, formando de 250 a 300 compartimentos, chamados lóbulos testiculares. Em cada lóbulo se

encontram de duas a quatro alças ou novelos de túbulos seminíferos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BERNE; LEVY, 2009). Externamente à albugínea, nas regiões anterolaterais, localiza-se a túnica vaginal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os túbulos seminíferos criam dois compartimentos em cada lóbulo. Um intratubular, composto pelo epitélio seminífero e um peritubular, composto por vasos sanguíneos, canais linfáticos, macrófagos e as células intersticiais de Leydig (MORAES; ÉBOLI; PASQUALOTTO, 2007; BERNE; LEVY, 2009).

2.1.1.1 Túbulos seminíferos

É nos túbulos seminíferos (Figura 3) que os espermatozoides são produzidos. São tubos tortuosos, em formato de U, com 30 a 70 cm de comprimento e seus diâmetros variam de 150 a 250 μm . Se fossem todos unidos em um único filamento, este mediria aproximadamente 250 m (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

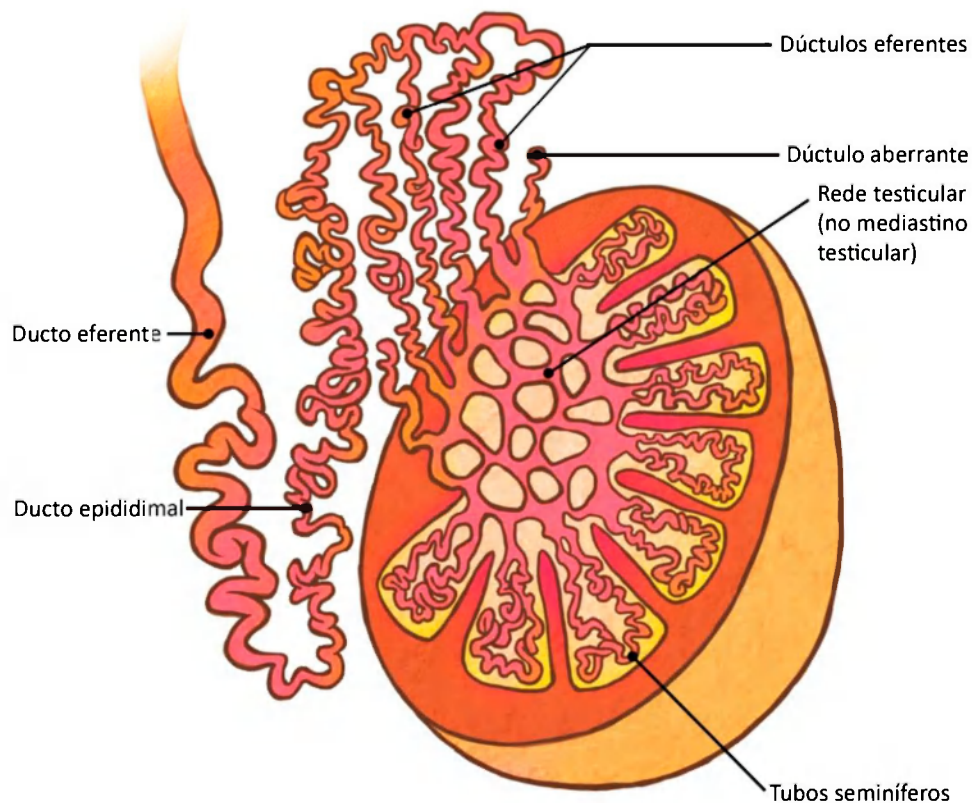


FIGURA 3 – ESTRUTURA INTERNA DO TESTÍCULO.

FONTE: A Autora (2013).

CRÉDITOS: Tiffany Chang.

Um volume de 70 % dos testículos é ocupado por 250 a 1000 túbulos seminíferos. Localizados no interior dos lóbulos dos testículos, os túbulos seminíferos são enovelados e formam uma alça (MORAES; ÉBOLI; PASQUALOTTO, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Suas extremidades terminam nos túbulos retos que continuam na rede testicular, *rete testis*, de onde saem de 10 a 20 dúctulos eferentes, que se fundem gradualmente para formar o ducto epididimal (MORAES; ÉBOLI; PASQUALOTTO, 2007; AIRES *et al.*, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os túbulos seminíferos são revestidos por epitélio seminífero, que é composto por células espermáticas, em diferentes estágios da espermatogênese, e células de Sertoli. Estas se estendem da lâmina basal ao lúmen e proporcionam suporte estrutural ao epitélio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BERNE; LEVY, 2009), e auxiliam também na liberação de espermatozoides na luz tubular (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BERNE; LEVY, 2009).

Junções estreitas entre as células de Sertoli formam uma barreira, que cria um ambiente protetor para as células germinativas contra agentes nocivos (AIRES *et al.*, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BERNE; LEVY, 2009), a chamada barreira hematotesticular, a qual separa as espermatogônias e os espermátócitos primários das demais formas celulares da espermatogênese (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BERNE; LEVY, 2009).

2.1.2 Epidídimo

Estrutura tubular única com 4 a 5 m de comprimento, fortemente enovelada, formando um órgão alongado medindo de 6 a 7 cm, localizado acima do testículo (MORAES; ÉBOLI; PASQUALOTTO, 2007). Sua função consiste na maturação, armazenamento e transporte dos espermatozoides (JANINI; PEREIRA, 2001).

No epidídimo ocorre a etapa final da maturação dos espermatozoides, durante sua passagem até o canal deferente, processo que dura de 1 a 3 semanas. Nesta fase a motilidade máxima do espermatozoide é adquirida e ele se torna apto a participar do processo de fecundação (KJELDSBERG; KNIGHT, 1993; AIRES *et al.*, 2008). Nele, os espermatozoides também passam por um processo chamado decapacitação, através de mudanças em suas membranas celulares, que os

impedem de sofrer a reação acrossômica antes que ocorra o contato com o óvulo (BERNE; LEVY, 2009).

2.1.3 Canal deferente

O canal deferente possui 35 a 40 cm de comprimento e 2 mm de diâmetro, no qual os espermatozoides ficam armazenados e podem se manter viáveis por meses (JANINI; PEREIRA, 2001; BERNE; LEVY, 2009). O canal deferente parte do epidídimo e esvazia seu conteúdo na uretra prostática. Em sua parte final, ele se dilata, formando uma região denominada ampola, na qual desembocam as vesículas seminais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A espessa camada de musculatura lisa que envolve este canal é bastante enervada por nervos simpáticos. Desta forma, outra função deste canal, é a de propelir o esperma para a uretra, durante o ato sexual. O esvaziamento do conteúdo que então ocorre, denominado emissão, precede imediatamente a ejaculação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BERNE; LEVY, 2009).

2.1.4 Vesículas seminais

São órgãos saculares alongados, muito enovelados, que possuem de 5 a 7 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro (JANINI; PEREIRA, 2001; MORAES; ÉBOLI; PASQUALOTTO, 2007). Sua função é produzir o líquido seminal, que é viscoso, de pH alcalino, amarelo e representa 70 % do volume total do sêmen (JANINI; PEREIRA, 2001; KIERSZENBAUM, 2002; GUYTON, 2008). Sua secreção é rica em frutose, fonte energética para a motilidade dos espermatozoides (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Outro componente importante é a semenogelina, que induz a coagulação do sêmen logo após a ejaculação (BERNE; LEVY, 2009).

2.1.5 Canais Ejaculadores

Estes canais possuem 2 cm de comprimento e atravessam a próstata, iniciando na junção do canal deferente com as vesículas seminais e terminando na porção prostática da uretra. A parte que entra na próstata é o chamado ducto ejaculatório (JANINI; PEREIRA, 2001; KIERSZENBAUM, 2002).

2.1.6 Próstata

A próstata apresenta o tamanho aproximado ao de uma castanha da Índia, com 4 cm de largura, 2,5 cm de espessura e 3 cm de comprimento, pesando cerca de 20 g (MORAES; ÉBOLI; PASQUALOTTO, 2007), constituindo-se da associação de 30 a 50 glândulas menores, cujos ductos secretam diretamente na uretra prostática (MORAES; ÉBOLI; PASQUALOTTO, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O líquido prostático secretado é fluído, leitoso e alcalino e serve para neutralizar os líquidos acídicos do epidídimo e do canal deferente, fazendo com que os espermatozoides saiam do estado de inatividade, ou seja, estimulando sua motilidade (GUYTON, 2008). Esta secreção corresponde a cerca de 30 % do volume do sêmen, é rica em citrato, zinco, espermina e fosfatase ácida, e apresenta ainda o antígeno prostático (PSA). O PSA é uma serina-protease responsável por liquefazer o coágulo após alguns minutos, utilizado como indicador de saúde prostática (BERNE; LEVY, 2009), cujo aumento da concentração está relacionado a neoplasias malignas.

2.1.7 Uretra

A uretra masculina possui, em sua totalidade, 20 cm de comprimento e por ela passa todo o líquido seminal, que é depositado em partes e se junta ao longo do processo. Ela é dividida em três partes: prostática, membranosa e cavernosa ou esponjosa (CASTRO, 1985; KIERSZENBAUM, 2002).

A uretra prostática possui cerca de 3 cm de comprimento e recebe a secreção dos ductos prostáticos. A uretra membranosa, a menor delas, possui cerca de 1 cm de comprimento e recebe a secreção das glândulas de Cowper. A uretra cavernosa ou esponjosa, a porção mais longa, medindo cerca de 15 cm, está localizada dentro do pênis e recebe a secreção das glândulas de Littré (CASTRO, 1985; KIERSZENBAUM, 2002).

2.1.8 Glândulas Bulbouretrais ou de Cowper

Possuem de 3 a 5 mm de diâmetro e se localizam na porção membranosa da uretra (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Sua secreção, liberada neste local, precede a liberação do sêmen (KIERSZENBAUM, 2002). O líquido secretado, claro, viscoso e rico em muco, é responsável por lubrificar, limpar e tamponar a uretra (BERNE; LEVY, 2009).

2.1.9 Glândulas de Littre

São glândulas secretoras de muco, localizadas ao longo da uretra cavernosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

2.1.10 Pênis

O pênis é o órgão sexual masculino externo (GUYTON, 2008). Ele é composto por três corpos cilíndricos de tecido erétil, sendo dois corpos cavernosos e um corpo esponjoso, o qual é atravessado pela uretra cavernosa ou esponjosa. Na extremidade do pênis há uma expansão em forma cônica, chamada glândula (MORAES; ÉBOLI; PASQUALOTTO, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BERNE; LEVY, 2009). O pênis apresenta função dupla, como órgão excretor da urina e como órgão de cópula, possibilitando a deposição do sêmen no trato genital feminino (GARTNER; HIATT, 2007).

2.2 ESPERMATOGÊNESE

O processo de espermatogênese (Figura 4), responsável pela proliferação e diferenciação dos gametas masculinos, dura aproximadamente 72 dias (BERNE; LEVY, 2009) e engloba desde a espermatogônia até o espermatozoide (GARTNER; HIATT, 2007).

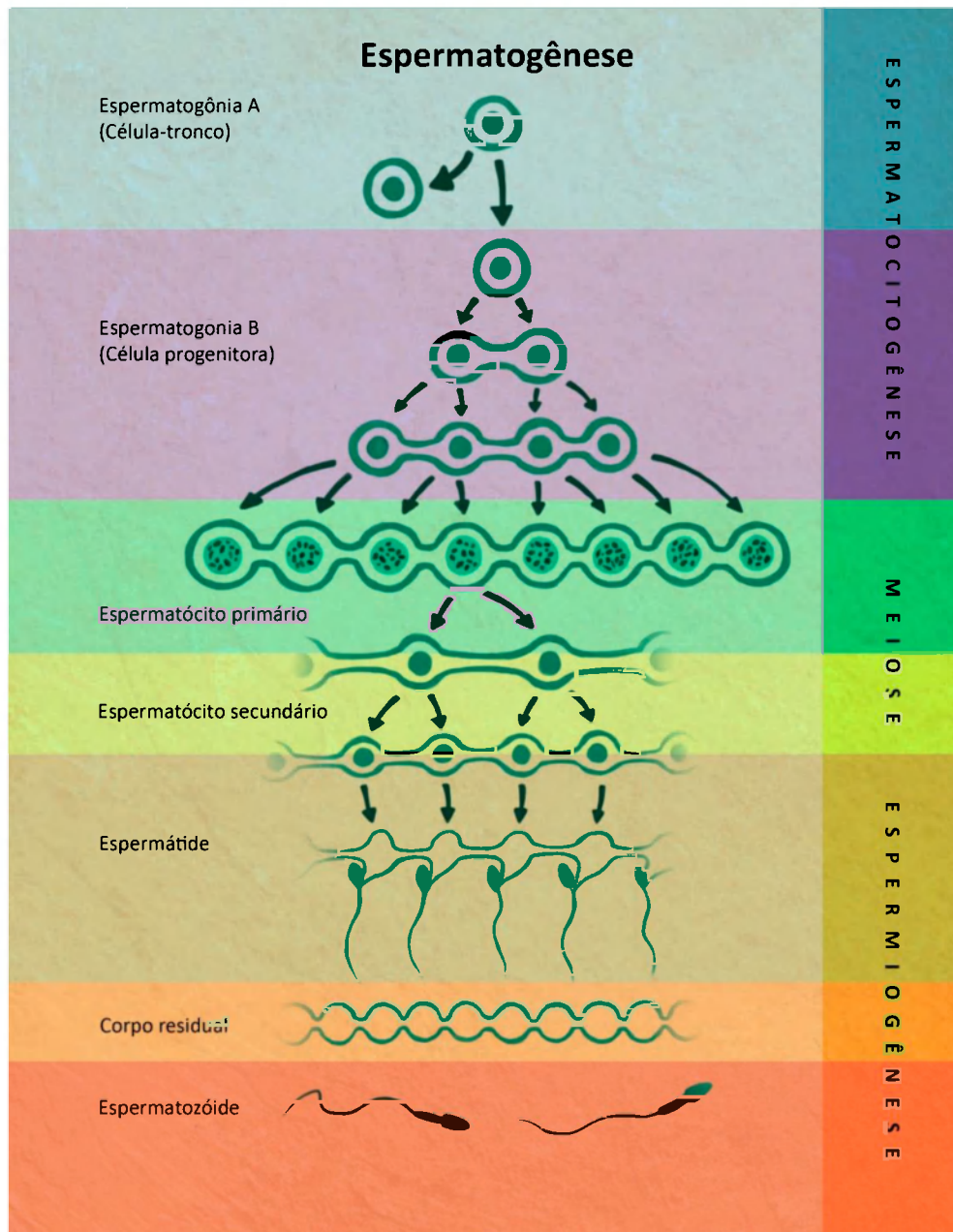


FIGURA 4 – ETAPAS DA ESPERMATOGÊNESE.

FONTE: A Autora (2013).

CRÉDITOS: Tiffany Chang.

O início se dá com a espermatogônia, célula germinativa primitiva, que se localiza próxima à lâmina basal do epitélio. As espermatogônias se dividem por mitose, gerando células-filhas que podem seguir dois caminhos: manterem-se como células-tronco, chamadas de espermatogônias do tipo A; ou diferenciarem-se durante as divisões, tornando-se assim as células progenitoras, chamadas de espermatogônias do tipo B (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A partir daí, convencionou-se subdividir a espermatogênese em três fases:

espermatoctogênese, meiose e espermiogênese (MORAES; ÉBOLI; PASQUALOTTO, 2007).

Para que haja um sincronismo no desenvolvimento das células, as divisões são acompanhadas por citocinese incompleta, ou seja, as células que resultam da divisão das espermatogônias do tipo B não se separam completamente, mas se mantêm interconectadas por uma ponte citoplasmática (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BERNE; LEVY, 2009).

2.2.1 Espermatocitogênese

A proliferação das espermatogônias por mitose gera espermatogônias do tipo B, e novo processo de mitose gera os espermatócitos primários. As espermatogônias de tipo B apresentam 12 µm de diâmetro, núcleo esférico com 6 a 7 µm de diâmetro, grânulos, dos quais alguns aderem à carioteca, deixando-a bastante visível. O citoplasma é claro, podendo conter glicogênio (MORAES; ÉBOLI; PASQUALOTTO, 2007).

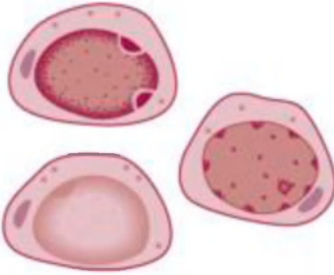
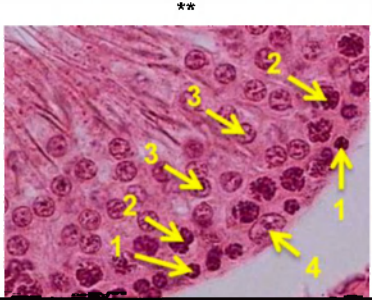

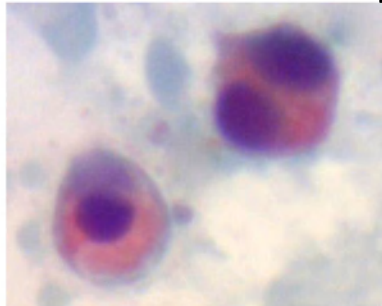
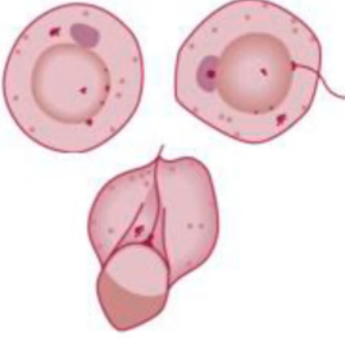
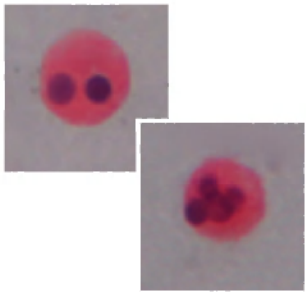


2.2.2 Meiose

Os espermatócitos primários passam por uma divisão, gerando os espermatócitos secundários. Estes sofrem nova divisão, originando as espermatídes. Os espermatócitos primários possuem núcleos com grânulos de cromatina escuros e nucléolo centralizado. Os espermatócitos secundários possuem núcleos menores e sua cromatina apresenta granulações finas e escuras (MORAES; ÉBOLI; PASQUALOTTO, 2007). As espermatídes apresentam 7 a 8 µm de diâmetro (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

2.2.3 Espermiogênese

Na etapa final da espermatogênese ocorre a transformação das espermatídes em espermatozoides, com o reposicionamento do núcleo e o aparecimento do flagelo (AIRES *et al.*, 2008). Não há divisão celular neste processo e o espermatozoide maduro é liberado no lúmen do túbulo seminífero (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

As células da espermatogênese acima descritas estão esquematizadas no Quadro 1.

TIPO	CARACTERÍSTICAS	FIGURA	FOTOMICROGRAFIA
ESPERMATOGÔNIA	Células redondas com 5 a 12 μm de diâmetro. Núcleo único, grande, intensamente basofílico. Citoplasma densamente corado.		
ESPERMATOCITO	Células redondas com 17 a 19 μm de diâmetro. Núcleo grande, 11 a 12 μm , discretamente basofílico, cromatina filamentososa. Podem ser binucleados. Citoplasma finamente granulado ou homogêneo, cianofílico, vacúolos isolados ou agrupados na periferia. Possui zona clara próxima ao núcleo.		
ESPERMATÍDE	Células polimorfas, redondas, ovaladas ou afiladas com 5 a 13 μm de diâmetro. Núcleo central ou periférico com 4,5 a 6 μm , intensamente basofílico, cromatina bastante condensada, geralmente unitário, podendo ter até 4. Citoplasma bem corado, cianofílico, homogêneo, com pequenos vacúolos. Pode ter pequena cauda.		
ESPERMATOZOIDE	Cabeça 4 a 5,5 μm x 2,5 a 3,5 μm . Região acrossômica 40 a 70 % da cabeça. Gota citoplasmática até 1/3 do tamanho da cabeça.		

QUADRO 1 – ESQUEMA DAS CELULAS DA ESPERMATOGENESE APRESENTANDO SUAS DIMENSÕES E CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.

FONTE: Texto: JANINI; PEREIRA, 2001; MORAES; ÉBOLI, PASQUALOTTO, 2007; Figuras: GOLDMAN; AUSIELLO, 2008 (Adaptado); fotos**: UFPEL (2013); fotos*: A Autora (2013).

CRÉDITOS: Fotos*: Thiago Beltrami Dias Batista.

NOTAS: *Fotos de células da espermatogênese em aumento de 1000x e coloração de Papanicolaou; **túbulo seminífero: espermatogônia (1), espermatócito primário (2), espermatíde (3), célula de Sertoli (4), aumento de 400x.

2.3 INFERTILIDADE

A infertilidade masculina pode ter diversas causas, sendo a varicocele a mais documentada na literatura, apesar de não ser conhecida a maneira exata como sua etiologia afeta a espermatogênese (WALSH *et al.*, 2009). Acredita-se que a função testicular é afetada, com o aumento da temperatura no escroto pelo refluxo do sangue abdominal (JAROW, 2001).

A varicocele atinge 15 a 20 % da população masculina, mas nem todos os homens terão infertilidade como decorrência dessa condição clínica (PASQUALOTTO *et al.*, 2006), na qual pode ocorrer diminuição do número de espermatozoides e baixa qualidade do sêmen (JAROW, 2001; WHITE *et al.*, 2011).

A orquite pós caxumba gera a orquiepididimite, que destrói o epitélio dos túbulos seminíferos. Se afetar ambos os testículos, o paciente apresenta azoospermia, ausência total de espermatozoides, ou oligospermia, contagem baixa de espermatozoides (JANINI; PEREIRA, 2001).

O tabagismo altera os níveis hormonais séricos de testosterona e estradiol e pode causar diminuição no volume seminal ou até mesmo fragmentação no DNA dos espermatozoides (PASQUALOTTO *et al.*, 2006).

A infertilidade também pode ter causas imunológicas. Deve-se investigar a presença de anticorpos anti-espermatozoides quando houver aglutinação e, principalmente, dímeros móveis (GILBERT; COOPER; GOLDSTEIN, 1992). Estes anticorpos podem ser encontrados em 4 a 8 % dos homens considerados inférteis e as análises seminais podem apresentar aglutinação de espermatozoides, com motilidade severamente prejudicada (SAMPLASKI *et al.*, 2010).

Outra causa de infertilidade se deve ao posicionamento dos testículos, quando um ou os dois testículos permanecem fora da bolsa escrotal, condição conhecida como criptorquidia verdadeira. Neste caso, eles ficam localizados na cavidade abdominal, fazendo com que o testículo apresente consistência diminuída e o paciente possua número menor de espermatogônias, células precursoras do espermatozoide (JANINI; PEREIRA, 2001).

2.4 FUNÇÃO ESPERMÁTICA

A análise seminal, apesar de ser importante para o diagnóstico da infertilidade, se apresentar resultados dentro da normalidade não pode garantir a função espermática e, muito menos, a fertilidade do casal. Desta forma, em casos não esclarecidos pelo espermograma, pode-se realizar testes para avaliar o desempenho dos espermatozoides, como, por exemplo: o teste da penetração espermática, que fornece dados sobre a capacidade de fertilização do espermatozoide; o da reação acrossômica, que avalia a ligação dos espermatozoides aos óvulos; o da hemizona pelúcida humana, que avalia a ligação do espermatozoide com a zona pelúcida do óvulo; o teste do edema hiposmótico, que avalia a vitalidade espermática, ou seja, a integridade da membrana do espermatozoide. Há ainda os testes de interação dos espermatozoides com o muco cervical, sendo o mais importante o teste pós-coital, os quais avaliam se há dificuldades na passagem dos espermatozoides pelo muco cervical (GILBERT; COOPER; GOLDSTEIN, 1992; LAMB, 2010; SAMPLASKI *et al.*, 2010).

2.5 ESPERMOGRAMA

A grande diversidade de metodologias existentes para a realização de uma mesma análise gera variabilidade excessiva nos resultados do espermograma. Cada laboratório segue metodologia própria ou escolhe entre as diversas existentes citadas na literatura. Este fato acarreta dificuldades na interpretação de resultados para o encaminhamento ou não de pacientes a tratamentos específicos, o que pode gerar erros de conduta.

No sentido de padronizar a metodologia a ser empregada, a Organização Mundial da Saúde (OMS) elaborou, em 1980, seu primeiro Manual, o *The WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*, com propostas de metodologias e uma série de recomendações para a realização do espermograma, baseadas em estudos técnico-científicos. Desde então, este Manual vem sendo revisado, atualizado e complementado, sendo válida atualmente sua 5ª edição de 2010, que descreve detalhadamente todas as análises, no qual se baseia este trabalho.

A descrição das técnicas propostas pelo Manual da OMS para análise do sêmen humano, 5ª edição, está apresentada abaixo.

2.5.1 Procedimentos pré-analíticos

O paciente deve receber por escrito todas as informações necessárias para a coleta. O período de abstinência sexual deve ser de 2 a 7 dias. Em caso de nova coleta, deve-se respeitar o mesmo período. O material deve ser coletado integralmente, ou seja, nada deve ser descartado. A amostra deve ser coletada, preferencialmente no laboratório, em sala própria para este fim, por masturbação e ejaculada em frasco limpo, de vidro ou material plástico não tóxico para os espermatozoides, devidamente identificado com nome do paciente, idade, código do paciente, período de abstinência, dia e hora da coleta. A análise deve ser realizada assim que ocorrer sua liquefação.

2.5.2 Exames macroscópicos

2.5.2.1 Liquefação

A liquefação completa geralmente ocorre entre 15 a 30 min, em banho-maria a 37 °C. Deve-se relatar se, em um período de 60 min, a amostra ainda apresentar coágulos. A liquefação incompleta apresenta grumos mucosos que interferem na contagem de espermatozoides. Para que se possa prosseguir, então, com as análises, deve-se agitar mecanicamente ou expor o material à bromelina na concentração de 10 UI/ml.

2.5.2.2 Viscosidade

O líquido seminal, com viscosidade normal, após aspiração através de uma pipeta graduada com 1,5 mm de diâmetro, deve fluir em pequenas gotas ou formar filetes com até 2 cm de comprimento.

2.5.2.3 Aspecto

Uma amostra normal, após a liquefação, tem aparência homogênea, de opalescência acinzentada. Em caso de baixa concentração de espermatozoides, a amostra será menos opaca. Pode também apresentar alterações na cor, como, por exemplo, amarelada em caso de maior período de abstinência sexual, ou castanha se houver presença de hemácias.

2.5.2.4 Volume

O volume exato do ejaculado deve ser medido e anotado, pois dele depende o cálculo da concentração espermática. A melhor maneira de realizar esta medição é se o próprio frasco de coleta for graduado, para evitar desperdício de material. O valor de referência mínimo é de 1,5 ml.

2.5.2.5 pH

O pH deve ser medido preferencialmente 30 min após a coleta, mas de forma alguma após 60 min, porque é alterado pela perda de CO₂, que ocorre em função do tempo. Uma amostra normal deve ter pH maior ou igual a 7,2. Para a análise, deve-se colocar uma gota da amostra homogeneizada em fita de pH de intervalo 6,0 a 10,0.

2.5.3 Exames microscópicos

Para que cada análise seja feita corretamente, é de extrema importância que se realize uma homogeneização antes de cada pipetagem, ou seja, antes de cada nova tomada de alíquota, para evitar que haja sedimentação. Esta homogeneização pode ser feita mexendo gentilmente a amostra ou aspirando-a e soltando cuidadosamente, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur; em ambos os casos, com muito cuidado para evitar a formação de bolhas.

Para a observação de lâminas das análises a fresco, recomenda-se a colocação de 10 µl de líquido seminal sobre a lâmina, recobrimo-se com lamínula de 22x22 mm, o que confere uma espessura de 20 µm ao preparado, e observa-se

os espermatozoides sob aumento de 200x ou 400x. Após a montagem da lâmina espera-se aproximadamente 60 s para o material assentar e conta-se um mínimo de 200 espermatozoides por replicata, em pelo menos cinco campos microscópicos.

De acordo com o Manual da OMS para análise do sêmen humano, 5ª edição, as diversas contagens devem ser realizadas em replicata e ambos resultados devem estar dentro de um intervalo de confiança de 95 %. Se os valores obtidos não estiverem dentro deste intervalo, os resultados devem ser descartados e duas novas contagens devem ser realizadas.

2.5.3.1 Aglutinação e agregação

Para esta análise, utiliza-se uma alíquota de 10 µl de sêmen e segue-se o padrão de montagem descrito. Pode ser realizada na mesma lâmina preparada para motilidade.

Agregação é a adesão entre espermatozoides imóveis, ou entre espermatozoides móveis e muco, outras células e restos celulares (WHO, 2010).

Aglutinação (Figura 5) é a adesão entre espermatozoides móveis pela cabeça, peça intermediária ou cauda. Sempre deve ser relatada de acordo com os seguintes valores de referência: Isolado = menos de 10 espermatozoides; Moderado = 10 a 50 espermatozoides; Acentuado = mais de 50 espermatozoides; Grosseiro = todos os espermatozoides.














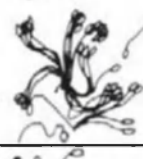

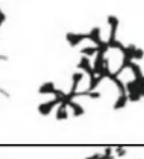




Partes envolvidas	Grau de Aglutinação			
	Isolado (< 10 spz)	Moderado (10-50 spz)	Acentuado (> 50 spz)	Grosseiro (todos)
Cabeça/cabeça				
Cauda/cauda (cabeças livres)				
Ponta cauda/ponta cauda				
Misto (cabeça/cabeça e cauda/cauda)				
Entrelaçado (cabeça e cauda entrelaçados)				

FIGURA 5 – GRAU DE AGLUTINAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES E PARTES ENVOLVIDAS.
 FONTE: WHO (2010) (Adaptada).
 NOTA: Spz = espermatozoide.

2.5.3.2 Motilidade

A motilidade deve ser avaliada logo que ocorrer a liquefação, para evitar efeitos deletérios de desidratação, pH e mudanças da temperatura. Para montagem da lâmina utiliza-se uma alíquota de 10 µl de sêmen recoberta por lamínula. A escolha do campo deve ser randômica, evitando-se as bordas, na largura de 5 mm, por causa do ressecamento, e a contagem deve começar imediatamente após a focalização.

Todo espermatozoide que estiver no campo após a focalização deve ser contado e, por outro lado, os que entrarem depois, não. Os primeiros a serem contados devem ser os espermatozoides com motilidade progressiva, seguidos pelos de motilidade não progressiva e, finalmente, pelos imóveis.

A motilidade progressiva refere-se àqueles espermatozoides que saem do lugar. Os de motilidade não progressiva se movimentam, mas não saem do lugar, ou seja, apresentam apenas batimento flagelar ou movimento de cabeça. Os imóveis não apresentam movimento algum. Um exame normal possui no mínimo 32 % de motilidade progressiva e 40 % de motilidade total (progressiva e não progressiva).

A motilidade é avaliada em porcentagem, e, de acordo com o Manual da OMS para análise do sêmen humano, 5ª edição, a diferença entre duas porcentagens da mesma amostra deve seguir o intervalo de confiança de 95 % (Quadro 2).

Média %	Diferença*	Média %	Diferença*
0	1	66-76	9
1	2	77-83	8
2	3	84-88	7
3-4	4	89-92	6
5-7	5	93-95	5
8-11	6	96-97	4
12-16	7	98	3
17-23	8	99	2
24-34	9	100	1
35-65	10		

QUADRO 2 – DIFERENÇAS ACEITAVEIS ENTRE PORCENTAGENS DE DIFERENTES REPLICATAS.

FONTE: WHO, 2010 (Adaptado).

NOTAS: *Baseada no intervalo de confiança de 95 %; foi contado um mínimo de 200 espermatozoides por replicata.

2.5.3.3 Vitalidade

Para a análise da vitalidade, um método rápido é utilizar apenas a eosina. Assim, mistura-se 5 µl de sêmen com 5 µl de eosina Y 0,5 % na superfície da lâmina, cobre-se com a lamínula e deixa-se repousar por 2 min. Os espermatozoides vivos não ficarão corados e os mortos serão corados, tomando a coloração rosa. O valor de referência considerado mínimo para fertilidade é de 58 % de espermatozoides vivos.

2.5.3.4 Concentração

O termo concentração de espermatozoides refere-se ao número de espermatozoides por mililitro, enquanto concentração total refere-se ao seu número total no ejaculado.

Para a realização da contagem, deve-se fazer uma diluição de 1:2 a 1:20, de acordo com o número estimado de espermatozoides na amostra, na mesma preparação feita para a determinação da motilidade, por exemplo, de acordo com o Quadro 3.

Spz por campo	Diluição	Sêmen (µl)	Diluyente (µl)	Nº de campos*
> 101	01:20	50	950	4, 5 e 6
16 – 100	01:05	50	200	4, 5 e 6
2 – 15	01:02	50	50	4, 5 e 6
< 2	01:02	50	50	Todos

QUADRO 3 – DILUIÇÃO NECESSÁRIA PARA CONTAGEM DE ESPERMATOZOIDES EM CÂMARA DE NEUBAUER E CAMPOS DE LEITURA.

FONTE: WHO (2010) (Adaptado).

NOTAS: *Campos da câmara de Neubauer; spz = espermatozoides.

O diluyente a ser utilizado é composto por 50 g de bicarbonato de sódio, 10 ml de formalina a 35 % (v/v) e 0,25 g de azul de tripan ou 5 ml de violeta de genciana aquosa saturada com água destilada qsp 1000 ml. A contagem é realizada em câmara de Neubauer (Figura 6), em seu retículo central para contagem de eritrócitos. São contados apenas espermatozoides inteiros, ou seja, que possuam cabeça e cauda. Os valores mínimos de espermatozoides obtidos em homens considerados férteis devem ser de $15 \times 10^6/\text{ml}$ e de 39×10^6 no ejaculado.

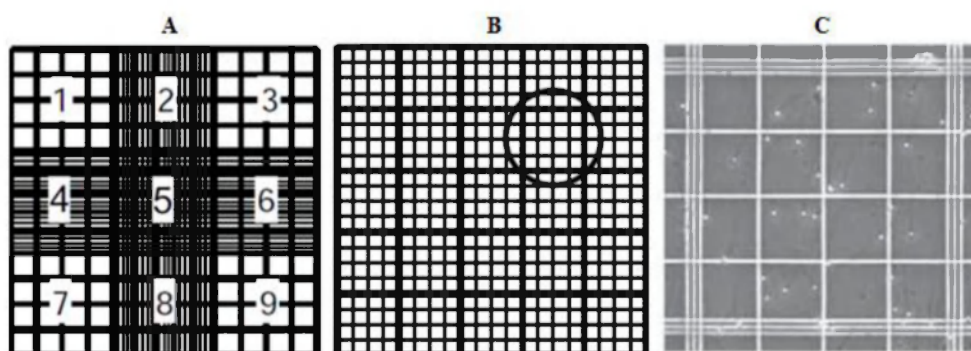


FIGURA 6 – ESTRUTURA INTERNA DA CÂMARA DE NEUBAUER.

FONTE: WHO (2010).

NOTAS: O quadrado central 5, com 1mm^2 (A), está aumentado (B) e um de seus 25 quadrados está representado (C); a profundidade da câmara é de 0,1 mm.

De acordo com o Manual da OMS para análise do sêmen humano, 5ª edição, as diferentes contagens de concentração devem estar dentro de um intervalo de confiança de 95 % (Quadro 4).

Contagem	Diferença*	Contagem	Diferença*	Contagem	Diferença*
35-40	12	144-156	24	329-346	36
41-47	13	157-169	25	347-366	37
48-54	14	170-182	26	367-385	38
55-62	15	183-196	27	386-406	39
63-70	16	197-211	28	407-426	40
71-79	17	212-226	29	427-448	41
80-89	18	227-242	30	449-470	42
90-98	19	243-258	31	471-492	43
99-109	20	259-274	32	493-515	44
110-120	21	275-292	33	516-538	45
121-131	22	293-309	34	539-562	46
132-143	23	310-328	35	563-587	47

QUADRO 4 – DIFERENÇAS ACEITAVEIS ENTRE AS SOMAS DAS CONTAGENS DE ESPERMATOZOIDES DE DIFERENTES REPLICATAS.

FONTE: WHO, 2010 (Adaptada).

NOTA: *Baseada no intervalo de confiança de 95 %.

2.5.3.5 Células redondas

Outros tipos celulares como, por exemplo, células epiteliais do trato uretral, células da espermatogênese e polimorfonucleares devem ser registrados, sendo convencionalmente chamá-las de células redondas. Sua concentração é determinada por contagem e cálculo em relação ao número de espermatozoides pela fórmula:

$$C = S \times (N/400),$$

onde: C = concentração de células redondas; S = concentração de espermatozoides; e N = número de células redondas contadas. Em caso de baixa contagem (menos de 25 células), deve-se apenas relatar que o número de células é insuficiente para cálculos.

2.5.3.6 Morfologia

Para a análise morfológica, deve-se fazer extensão do líquido seminal em lâmina limpa e deixar secar a preparação ao ar. A fixação do material na lâmina deve ser feita com etanol em diversas graduações e seguida pela coloração de Papanicolaou ou Shorr. A lâmina deve ser observada com objetiva de imersão (1000x).

Espermatozoides morfológicamente normais possuem cabeças ovais com 4 a 5,5 μm x 2,5 a 3,5 μm ; a região acrossômica compreende de 40 a 70 % da cabeça, sem defeitos no pescoço, peça intermediária ou cauda; e a gota citoplasmática não deve ser maior que 1/3 do tamanho da cabeça. Para que o exame seja considerado normal em relação à morfologia espermática, deve-se ter no mínimo 4 % de espermatozoides com morfologia normal (Figura 7), seguindo estritamente a descrição acima.

Os defeitos encontrados podem ser: Cabeça (Figura 8): grande, pequena, afilada, piriforme, *tapered* (alongada), redonda, amorfa, vacuolizada, dupla ou qualquer combinação; Peça intermediária (Figura 9): amorfa, fina, grossa, longa, curta, excêntrica, implantada de forma angular; Cauda (Figura 10): bicaudal, enrolada, grossa, fina, curta, longa, dobrada, quebrada, curva.

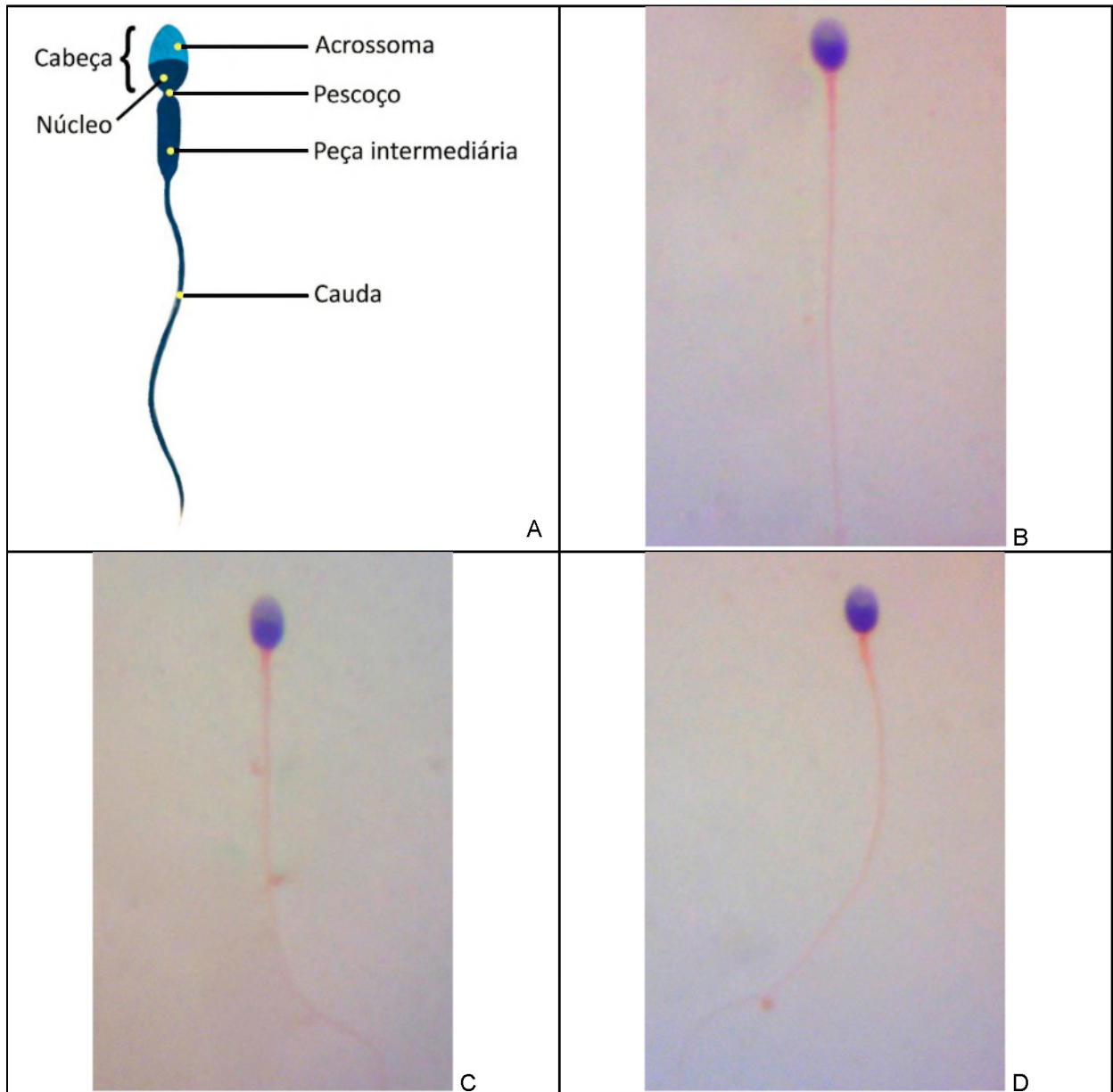

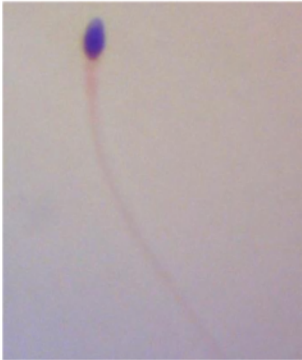






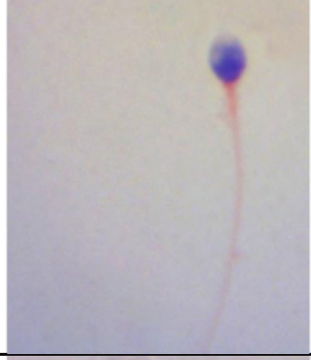

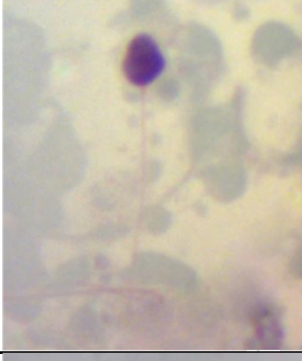



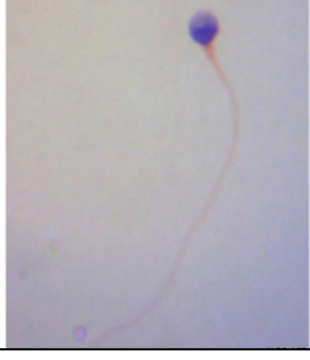


FIGURA 7 – ESPERMATOZOIDES NORMAIS.

FONTE: A Autora (2013).

CRÉDITOS: Figura: Tiffany Chang; fotos: Thiago Beltrami Dias Batista.

NOTAS: Em (A) desenho esquemático do espermatozoide normal; em (B), (C) e (D), fotos do espermatozoide normal em aumento de 1000x e coloração de Papanicolaou.

Defeito	Figura (A)	Foto (B)	Foto (C)
Afilada (<i>tapered</i>)			
Região acrossômica pequena			
Vacuolizada			
Amorfa			
Redonda			


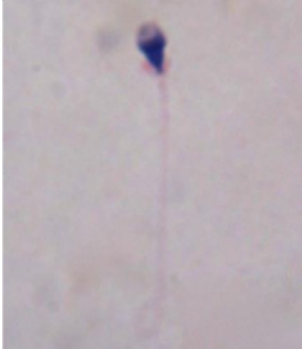
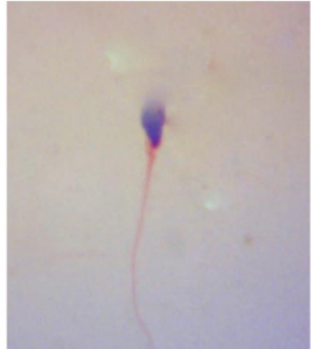




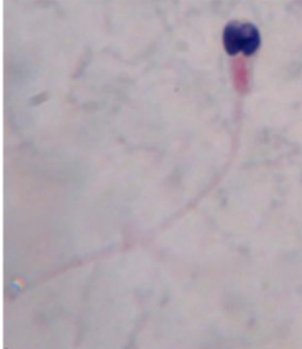
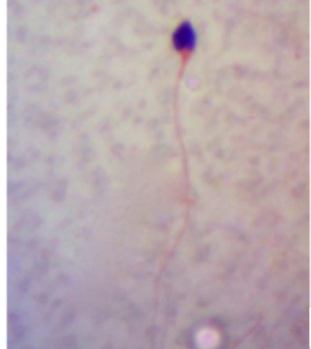
Defeito	Figura (A)	Foto (B)	Foto (C)
Piriforme			
Cabeça de alfinete (<i>pin head</i>)			
Duas cabeças			

FIGURA 8 – DEFEITOS DE CABEÇA DOS ESPERMATOZOIDES.

FONTE: A Autora (2013).

CRÉDITOS: Figuras: Tiffany Chang; fotos: Thiago Beltrami Dias Batista.

NOTAS: Em (A) desenho esquemático das anomalias de cabeça; em (B) e (C), fotos do espermatozoide anormal em aumento de 1000x e coloração de Papanicolaou.


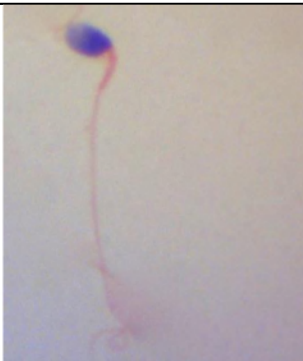
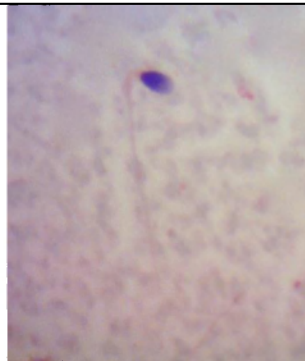


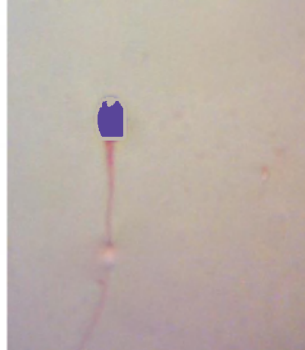





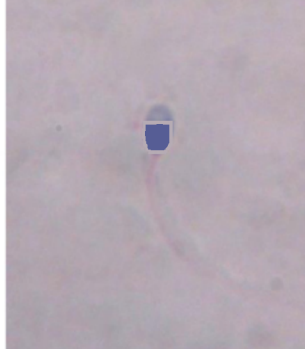




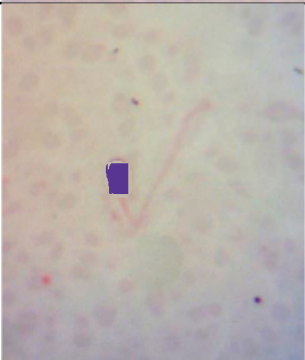
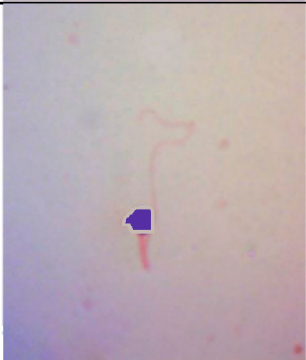

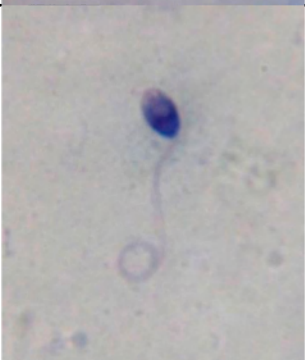
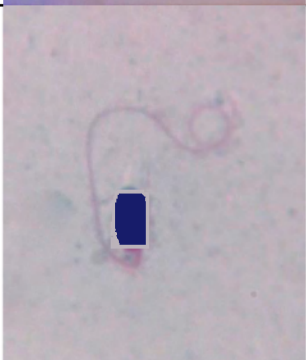

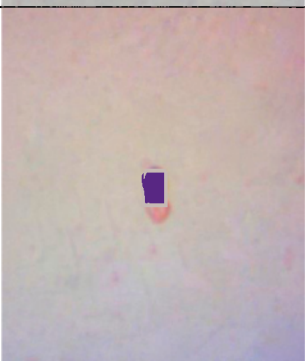

Defeito	Figura (A)	Foto (B)	Foto (C)
Pescoço quebrado			
Inserção assimétrica			
Pescoço grosso			
Pescoço fino			

FIGURA 9 – DEFEITOS DE PESCOÇO E PEÇA INTERMEDIÁRIA DOS ESPERMATOZOIDES.

FONTE: A Autora (2013).

CRÉDITOS: Figuras: Tiffany Chang; fotos: Thiago Beltrami Dias Batista.

NOTAS: Em (A) desenho esquemático das anomalias de pescoço e peça intermediária; em (B) e (C), fotos do espermatozoide anormal em aumento de 1000x e coloração de Papanicolaou.

Defeito	Figura (A)	Foto (B)	Foto (C)
Curta			
Quebrada			
Enrolada			
			

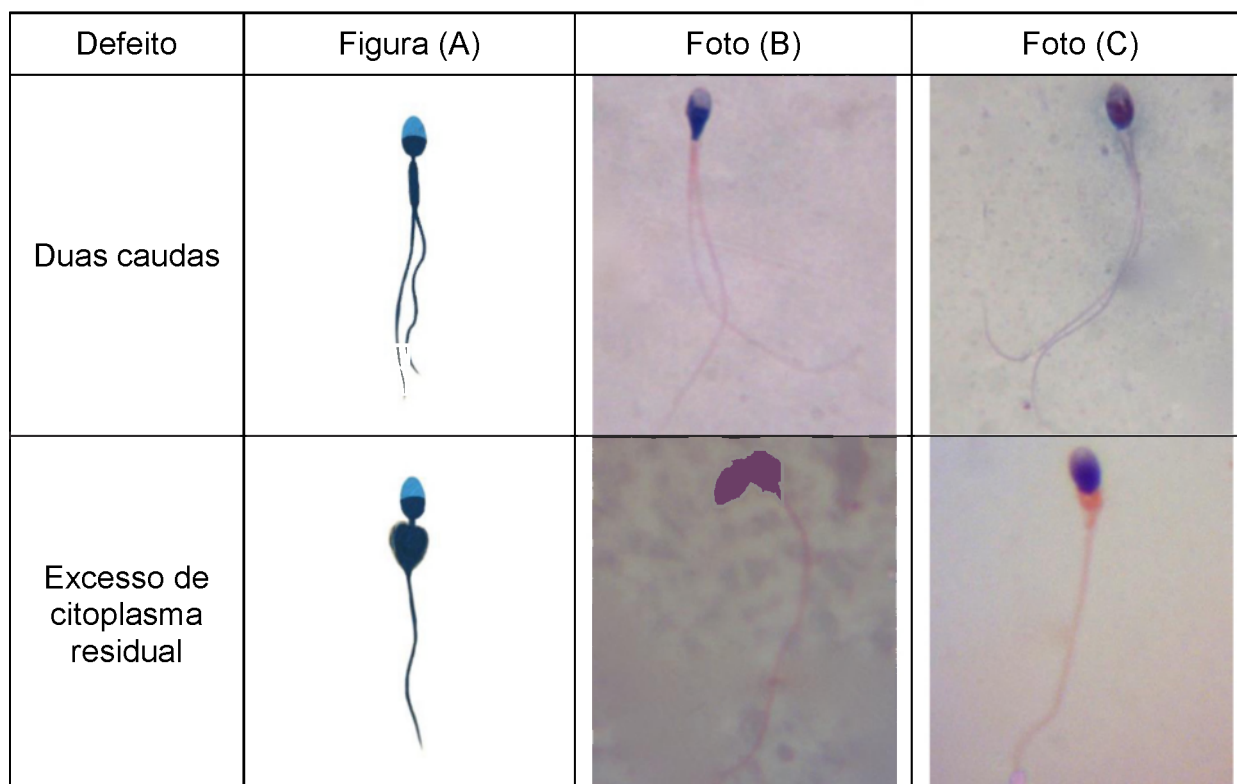


FIGURA 10 – DEFEITOS DE CAUDA DOS ESPERMATOZOIDES.

FONTE: A Autora (2013).

CRÉDITOS: Figuras: Tiffany Chang; fotos: Thiago Beltrami Dias Batista.

NOTAS: Em (A) desenho esquemático das anomalias de cauda; em (B) e (C), fotos do espermatozoide anormal em aumento de 1000x e coloração de Papanicolaou.

2.6 ANÁLISE AUTOMATIZADA

O objetivo da automatização é minimizar os erros interobservadores e padronizar parâmetros para análises, mas ainda há muitos problemas técnicos, por exemplo, a incapacidade de diferenciar espermatozoides, *debris* e células redondas. A contagem e a motilidade podem ser feitas de forma automatizada, mas estas avaliações serão melhores se realizadas manualmente, por um especialista treinado (GILBERT; COOPER; GOLDSTEIN, 1992).

A análise automatizada envolve o uso do computador para avaliar parâmetros como motilidade, concentração e morfologia (SAMPLASKI *et al.*, 2010), faz a avaliação físico-química e morfofuncional do sêmen. Um dos equipamentos utilizados é o Spermalite-SQA-V, que possui detectores óticos de motilidade e densidade espermática (SECCHI, 2005).

2.7 CONTROLE DE QUALIDADE

É de vital importância que os resultados das análises do líquido seminal sejam consistentes e confiáveis, tanto entre diferentes observadores num mesmo laboratório, quanto entre laboratórios diferentes. Ainda hoje existe muita variação de resultados. Isto se dá pelo não cumprimento das normas recomendadas pela OMS, também pelo fato de a análise seminal se tratar de um processo subjetivo, difícil de ser padronizado (FORD, 2010).

O controle de qualidade é importante para garantir resultados confiáveis ao detectar e corrigir erros sistemáticos devido à grande variabilidade de resultados possíveis para o sêmen (PACEY, 2006; WHO, 2010).

O erro ocorrido no laboratório pode ser randômico, afetando a precisão e surge das diferenças em leituras ou amostras, porém, é simples de ser estudado, apenas fazendo-se repetidas medições pelo mesmo observador e equipamento. Por outro lado, os erros sistemáticos são mais complexos, pois alteram os resultados em uma única direção e não podem ser detectados em medições repetidas (WHO, 2010).

Para garantir menor variabilidade, acurácia, precisão, competência e conhecimento dos erros em curto prazo, é importante que exista um programa de controle de qualidade interno no laboratório (MATSON *et al.*, 1999; AUGER *et al.*, 2000; WHO, 2010).

A variabilidade intra e interlaboratorial pode vir a ter grande impacto sobre o paciente, pois resultados não condizentes podem levar a diferentes interpretações clínicas em relação à fertilidade. O controle de qualidade externo é importante para que estes resultados possam ser mais uniformes interlaboratorialmente (AUGER *et al.*, 2000) e a comparação entre resultados de diversos laboratórios, ou mesmo com resultados obtidos com metodologias e ou laboratórios de referência, podem revelar com maior precisão os problemas que a equipe interna muitas vezes não detecta (PALACIOS *et al.*, 2012).

Para que os resultados de morfologia espermática possam ser comparáveis entre os diversos laboratórios, primeiramente deve-se respeitar o procedimento a ser seguido, pois, por exemplo, diferentes tipos de coloração podem levar a diferentes resultados na avaliação morfológica. O Manual da OMS para análise do sêmen humano, 5ª edição, recomenda que seja utilizada a coloração de Papanicolaou

(MENKVELD, 2010). A forma de se preparar as extensões do líquido seminal em lâmina também pode influenciar na adequabilidade das amostras. Além disso, os critérios empregados e a forma como são valorizados pelo observador são fundamentais para definir a precisão e a exatidão da avaliação morfológica dos espermatozoides.

2.8 DIFERENÇAS ENTRE VALORES DE REFERÊNCIA DO ESPERMOGRAMA EMPREGADOS POR DIVERSOS LABORATÓRIOS

O Quadro 5 apresenta valores de referência para o espermograma preconizados no Manual da OMS nas suas 4^a e 5^a edições, de 1999 e 2010, respectivamente; e divulgados por laboratórios de análises clínicas de várias cidades brasileiras em seus respectivos sites.

O critério de busca utilizado foi a divulgação feita pelos laboratórios de análises clínicas em seus respectivos sítios na internet dos valores de referência para o espermograma.

Lab.	WHO, 1999	WHO, 2010	Automa- tizado	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5	Lab 6	Lab 7	Lab 8
Localização / Informações	4ª ed.	5ª ed.	Spermalite SQA-V	Paraná	Minas Gerais	São Paulo	Paraná	Minas Gerais	São Paulo	Rio de Janeiro	São Paulo
Prop. Físicas											
Liquefação		15 a 30 min		15 a 30 min		< 30 min	15 a 30 min	< 60 min	5 a 30 min	< 30 min	< 30 min
Cor		opalescente acinzentado		opalescente acinzentado		branco opalescente	opalescente acinzentado		branco pérola	branco opaco a cinza claro e amarelado	branco opaco
Volume	2 a 7 ml	> 1,5 ml		> 1,5 ml		2 a 5 ml	> 1,5 ml	> 2 ml	1,5 a 5 ml	2 a 5 ml	2 a 5 ml
pH	7,2 a 8,2	> 7,2		> 7,2		7,0 a 8,5	> 7,2	7,2 a 8,0	7,2 a 8,2	7,2 a 7,8	
Motilidade											
Total	> 50 %	> 40 %	> 50 %	> 40 %	> 38 %	> 50 %	> 40 %	> 50 %			> 50 %
Progressiva	> 25 %	> 32 %	> 25 %	> 32 %	> 31 %		> 32 %	> 25 %	> 32 %		> 25 %
Vitalidade											
Vivos	> 75 %	> 58 %		> 58 %			> 58 %	> 70 %	> 58 %	> 70 %	> 70 %
Contagem											
Spz/ml	> 20x10 ⁶	> 15x10 ⁶	> 20x10 ⁶	> 15x10 ⁶	> 15x10 ⁶	> 20x10 ⁶	> 15x10 ⁶	> 20x10 ⁶	> 15x10 ⁶	> 20x10 ⁶	> 20x10 ⁶
Spz total	> 40x10 ⁶	> 39x10 ⁶	> 40x10 ⁶	> 39x10 ⁶		> 50x10 ⁶	> 39x10 ⁶			> 40x10 ⁶	
Morfologia											
Normais	> 14 %	> 4 %	> 15 %	> 4 % (Kruger)	> 25 %	> 14 %	> 4 % (Kruger)	> 30 %	> 4 % (Kruger)	> 30 %	> 30 %

QUADRO 5 – VALORES DE REFERÊNCIAS EMPREGADOS POR DIFERENTES LABORATÓRIOS.

FONTE: Adaptado pela Autora (2013). WHO, 1999; WHO, 2010; SECCHI, 2005; ANDROLAB, 2012; HERMES PARDINI, 2012; BIOLIDER, 2012; SÃO CAMILO, 2012; HUMBERTO ABRÃO, 2012; BEHRING, 2012; SÉRGIO FRANCO, 2012; BIOANÁLISE, 2012.

Os valores de referência encontrados na internet, nos sites dos laboratórios, demonstram que há diversidade nas formas de avaliação e nas metodologias empregadas para as análises do espermograma. Esta variedade influencia no resultado final da análise e pode levar a interpretações errôneas, no caso de o paciente precisar mudar de clínica ou laboratório.

Já foi demonstrado na literatura (AYALA; STEINBERGER; SMITH, 1996; VAWDA; GUNBY; YOUNGLAI, 1996; OMBELET *et al.*, 1997; GUNALP *et al.*, 2001; GUZICK *et al.*, 2001; CHRISTENSEN; STRYHN; HANSEN, 2005; SRIPADA *et al.*, 2010) que algumas características seminais do espermograma, especificamente motilidade, concentração e morfologia têm um bom valor prognóstico para a fertilidade *in vivo* e *in vitro*. É possível, então, estimar a probabilidade de concepção de um casal baseado nos parâmetros seminais. No entanto, para melhorar este valor prognóstico, é importante conhecer os erros, padronizar a metodologia e implementar ações de controle de qualidade no laboratório de análise do sêmen.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a variabilidade dos resultados das análises de motilidade, concentração e morfologia no exame do líquido seminal, de acordo com as metodologias preconizadas pela Organização Mundial da Saúde em seu Manual *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*, 5ª edição (2010).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a reprodutibilidade das técnicas de motilidade, concentração e morfologia no exame do líquido seminal.
- ✓ Comparar os resultados encontrados para as contagens de espermatozoides por unidade de volume, utilizando-se a câmara de Neubauer e a câmara de Makler.
- ✓ Estabelecer um roteiro de Procedimentos Operacionais Padrão para o Espermograma, de acordo com o Manual da OMS para análise do sêmen humano, 5ª edição.
- ✓ Recomendar a implantação de controle de qualidade nos laboratórios de análises clínicas para avaliar a precisão e a reprodutibilidade das determinações do espermograma.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

O material utilizado para esta pesquisa foi o líquido seminal de 37 (trinta e sete) pacientes atendidos na Androlab Clínica e Laboratório de Reprodução Humana e Andrologia, Curitiba-PR, selecionados por amostragem de conveniência, que autorizaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo I), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em 3 de agosto de 2011, sob registro CEP/SD: 1176.101.11.08 e CAAE: 0101.0.091.000-11 (Anexo II). Não se aplicou critérios de exclusão relacionados à idade, condições clínicas dos pacientes ou aos resultados das determinações realizadas, com exceção da exclusão de amostras azoospermicas.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Procedimentos pré-analíticos

Os pacientes que procuraram a Clínica Androlab para atendimento, de março a novembro de 2012, receberam por escrito as informações necessárias para a forma correta de coleta de sêmen (Anexo III), realizada na própria clínica Androlab, em sala própria para este fim. Em seguida, receberam o TCLE, com informações a respeito da importância da pesquisa e de sua plena liberdade em participar ou não, por meio da autorização para que suas amostras de sêmen fossem usadas para esta pesquisa após a realização das análises pertinentes à investigação clínica de sua condição.

O material foi coletado em frasco limpo, de material plástico não tóxico para os espermatozoides, contendo uma etiqueta com nome e código do paciente, idade, período de abstinência, data e hora da coleta.

Foram realizadas as determinações possíveis em cada material coletado, de acordo com a metodologia descrita, dependendo das características biológicas de

cada amostra, de modo a permitir as análises, bem como tempo hábil para a realização das mesmas. Por estes motivos, houve variações do n para cada análise.

4.2.2 Exame macroscópico

Após a coleta, os frascos contendo o material foram levados para uma estufa a 37 °C, por aproximadamente 15 min, para que ocorresse a liquefação. Depois, o material foi vertido para um tubo graduado de fundo cônico (tubo de Falcon) com capacidade para 15 ml, para se medir o volume, incubar em banho-maria 37 °C e dar seguimento às análises.

4.2.3 Exame microscópico

Antes de cada nova análise, foi realizada uma nova homogeneização com a pipeta de Pasteur, aspirando e liberando o material por 10 vezes, com delicadeza para evitar a formação de bolhas.

4.2.3.1 Motilidade

Cada lâmina de motilidade foi preparada e lida imediatamente para evitar ressecamentos. Para sua montagem, uma alíquota de 10 µl de sêmen foi retirada imediatamente após se ter homogeneizado a amostra, depositada em lâmina de microscopia, recoberta com lamínula de 22x22 mm e observada sob aumento de 400x.

Para cada amostra, foram montadas de 2 a 4 lâminas, de acordo com as condições do material. Em caso de excesso de grumos, ou de viscosidade elevada, a contagem não foi realizada.

Selecionou-se campos microscópicos distantes ao menos 5 mm dos bordos, contando-se todos os espermatozoides que estivessem no campo após a focalização, e excluindo-se os que entrassem no campo após a mesma. Os primeiros a serem contados foram todos os espermatozoides com motilidade progressiva, seguidos pelos de motilidade não progressiva e, por último, os imóveis. O número mínimo de 200 espermatozoides foi contado, em cada preparação, em pelo menos 5 campos microscópicos. Em seguida, calculou-se as porcentagens de

espermatozoides com motilidade progressiva, com motilidade não progressiva e de espermatozoides imóveis.

4.2.3.2 Concentração

Para determinar a diluição a ser feita para as contagens, foram utilizados os dados apresentados no Quadro 3, de acordo com a contagem prévia dos espermatozoides na preparação feita para a determinação da motilidade. Após a estimativa prévia por campo, foram realizadas duas diluições consecutivas, para que a concentração final na câmara de Neubauer para contagem não fosse excessiva ou muito baixa.

Foram contados no mínimo 100 espermatozoides em câmara de Neubauer sendo os campos escolhidos de acordo com a quantidade contada (Figura 11). Apenas espermatozoides inteiros, com cabeça e cauda, foram contados, considerando-se os que estivessem em contato com as linhas limite da esquerda e de cima e desprezando aqueles em contato com as da direita e de baixo.

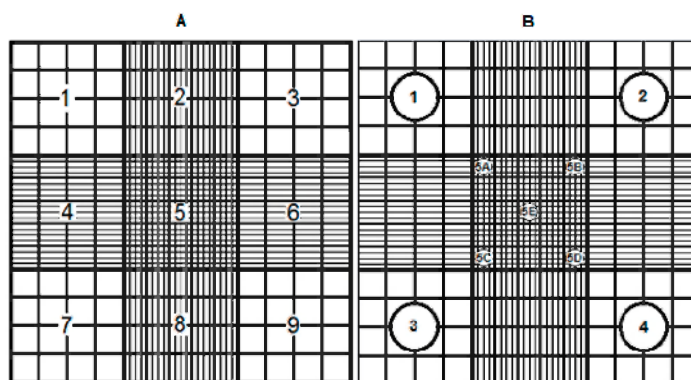


FIGURA 11 – CAMPOS PARA CONTAGEM DA CÂMARA DE NEUBAUER IMPROVED.

FONTE: A Autora (2013).

NOTAS: A câmara possui 3 mm de lado, sendo cada quadrado, de 1 a 9, com 1 mm cada, 0,1 mm de profundidade e 0,1 mm³ de volume.

Cada um dos nove quadrados da câmara de Neubauer possui 1 mm de lado e sua profundidade é de 0,1 mm. Para contagens realizadas nos campos 4, 5 e 6 da Figura 11-A, cujo volume total é de 0,3 mm³ por quadrado, a fórmula utilizada foi:

$$C = (N/n) \times (1/20) \times \text{fator de diluição},$$

onde N é o número de espermatozoides contados e n é o número de linhas por campo (20 nl e 5 linhas por cada campo). O resultado encontrado é spz/nl ou spz x 10^6 /ml.

Para contagens realizadas nos campos 1, 2, 3, 4 e 5 da Figura 11-B, o número de espermatozoides contados foi multiplicado por 2000. Quando se contou apenas o campo 5, inteiro, o número encontrado foi multiplicado por 10000. Já para os campos internos do quadrado 5, ou seja, 5A, 5B, 5C, 5D e 5E, o resultado foi multiplicado por 50000. Todos estes três tipos de cálculos foram também multiplicados por seus respectivos fatores de diluição.

A câmara de Makler (Figura 12) foi preenchida com 3 a 5 μ l de sêmen não diluído e a leitura foi feita em 10 (representados em cinza na figura) ou 100 campos (Figura 13). Apenas espermatozoides inteiros foram contados, considerando-se os que estivessem em contato com as linhas limite da esquerda e de cima e desprezando aqueles em contato com as da direita e de baixo.

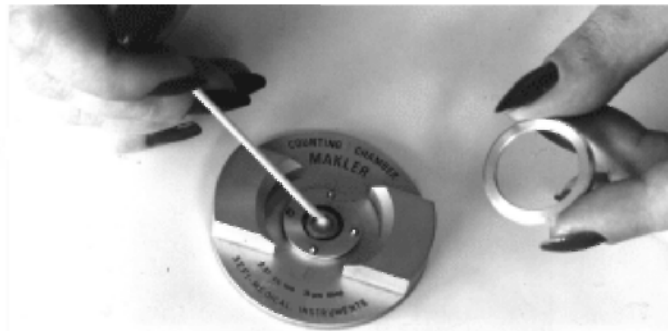


FIGURA 12 – CÂMARA DE MAKLER.
FONTE: SEPAL (2013); SEFI (2013).

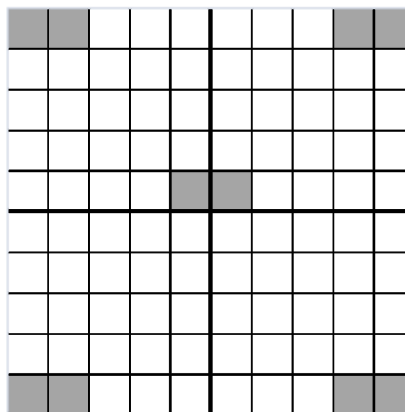


FIGURA 13 – ESTRUTURA INTERNA DA CÂMARA DE MAKLER.
FONTE: A Autora (2013).

NOTA: A câmara apresenta 1 mm de lado e 0,01 mm de profundidade, com $0,01 \text{ mm}^3$ de volume.

A câmara de Makler é dividida internamente em 100 quadrados. O quadrado grande possui 1 mm de lado, cada quadrado menor possui 0,1 mm de lado e sua profundidade é de 0,01 mm. Para 10 campos contados, o número encontrado de espermatozoides foi multiplicado por 1000000. Para 100 campos, o número encontrado foi multiplicado por 100000.

4.2.3.3 Morfologia

Na preparação da lâmina de microscopia para a análise da morfologia, foi colocada uma gota do sêmen e feita à extensão com o auxílio de lâmina extensora de bordo polido. A extensão foi seca ao ar, fixada com etanol a 95 %, e a coloração realizada foi a de Papanicolaou com kit da Newprov, de acordo com o Quadro 6.

Componente	Concentração	Ação
Etanol	80 %	15 mergulhos
Etanol	70 %	15 mergulhos
Etanol	50 %	15 mergulhos
Água destilada		15 mergulhos
Hematoxilina de Harris		45 s
Água corrente		até sair limpa (±5 min)
Etanol	50 %	15 mergulhos
Etanol	70 %	15 mergulhos
Etanol	80 %	15 mergulhos
Etanol	96 %	15 mergulhos
Orange G6		1 min
Etanol	96 %	15 mergulhos
Etanol	96 %	15 mergulhos
Etanol	96 %	15 mergulhos
EA 36		1:30 min
Etanol	96 %	15 mergulhos
Etanol	96 %	15 mergulhos
Etanol	96 %	15 mergulhos
Etanol	96 %	15 mergulhos
Xilol		15 mergulhos
Xilol		15 mergulhos
Xilol		15 mergulhos
Xilol		15 mergulhos
Verniz vitral		Montagem

QUADRO 6: MARCHA DA COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU DE ACORDO COM KIT NEWPROV. FONTE: NEWPROV (2013).

5 RESULTADOS

Para este trabalho, todas as contagens foram incluídas nos resultados, mesmo as que, segundo as informações do controle de qualidade do Manual da OMS para análise do sêmen humano, 5ª edição, ficaram fora do intervalo de confiança de 95 %, pois nosso objetivo é apresentar a reprodutibilidade das técnicas.

5.1 MOTILIDADE

A Tabela 1 e a Figura 14 mostram a variabilidade biológica de 15 amostras analisadas para motilidade, com 4 a 6 contagens em cada uma delas, num total de 69 contagens.

TABELA 1 – MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO DOS VALORES RELATIVOS PARA MOTILIDADE DOS ESPERMATOZOÍDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

Motilidade	Média (%)	Desvio padrão	CV (%)
Progressivos	32,3	17,74	54,91
Não progressivos	14,5	6,25	43,16
Imóveis	53,2	17,46	32,8

NOTA: n = 15, com 4 a 6 contagens para cada amostra, totalizando 69 contagens.

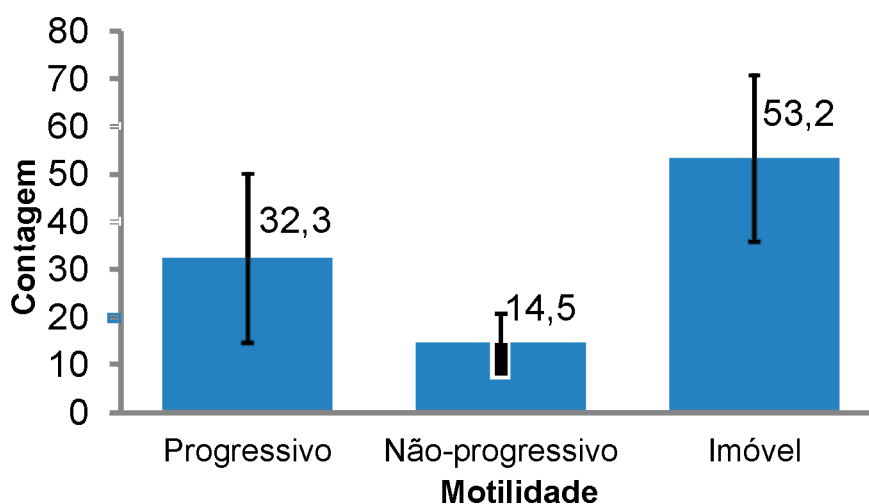


FIGURA 14 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS VALORES RELATIVOS PARA MOTILIDADE DOS ESPERMATOZOÍDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

NOTAS: n = 15, com 4 a 6 contagens para cada amostra, totalizando 69 contagens; as barras de erro representam os desvios padrão.

A Tabela 2 apresenta as médias das porcentagens encontradas por amostra e os valores mínimos e os máximos obtidos com as contagens. Mesmo alguns valores tendo aparecido fora do intervalo de confiança de 95 %, como foram realizadas de 4 a 6 contagens com cada amostra, o valor que difere dos outros poderia ser retirado.

TABELA 2 – MÉDIAS DAS PORCENTAGENS DE MOTILIDADE PROGRESSIVA, NÃO PROGRESSIVA E ESPERMATOZOÍDES IMÓVEIS NO LÍQUIDO SEMINAL DE PACIENTES DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

Paciente	Média (Min-Max)**		
	PR	NP	IM
1	60,3 (51,3-67,6)*	6,7 (6,0-7,4)	33 (25,5-42,7)*
2	41,4 (33,9-46,7)*	7,2 (3,0-12,3)*	51,4 (46,7-56,2)
3	15,3 (12,9-19,2)	8,6 (7,6-9,9)	76,1 (73,1-78,2)
4	23,5 (21,9-26,0)	23,0 (19,0-27,7)*	53,5 (49,5-55,2)
5	60,7 (58,0-64,0)	13,9 (11,2-16,5)	25,4 (24,0-28,1)
6	32,7 (31,3-35,1)	13,3 (9,6-15,5)	54 (51,9-56,3)
7	15,2 (6,9-19,6)*	21,9 (17,2-20,5)	62,9 (59,1-68,9)
8	11,7 (9,7-15,4)	15,6 (12,8-18,8)	72,7 (68,5-78,8)*
9	33,6 (31,4-36,1)	21,1 (19,3-23,0)	45,3 (43,8-46,6)
10	49,1 (44,5-49,5)	17,7 (11,8-22,3)*	33,2 (31,5-34,7)
11	35,3 (33,3-37,6)	17,6 (15,0-20,9)	47,1 (44,0-49,0)
12	11,2 (9,4-13,0)	5,3 (4,7-6,9)	83,5 (79,2-87,4)
13	22,8 (21,0-24,1)	19,6 (16,5-21,0)	57,6 (55,4-62,5)
14	50,8 (48,2-53,0)	15,2 (13,6-17,5)	34 (32,6-34,8)
15	13,2 (12,5-13,7)	13,9 (12,6-16,7)	72,9 (70,4-74,0)

NOTAS: n = 15, com 4 a 6 contagens para cada amostra, totalizando 69 contagens; *valores fora do intervalo de 95 % de confiança; PR – motilidade progressiva; NP – não progressiva; IM – imóveis; (Min-Max) – valores mínimos e máximos; **espermatozoides/ml.

As Figuras 15, 16 e 17 trazem as contagens por paciente e mostram os erros padrão médios obtidos com o emprego desta técnica. Cada ponto representa uma amostra. Todas as análises realizadas ficaram dentro do intervalo de confiança de 95 %, ou seja, na condição em que foi realizada, a reprodutibilidade da técnica é válida.

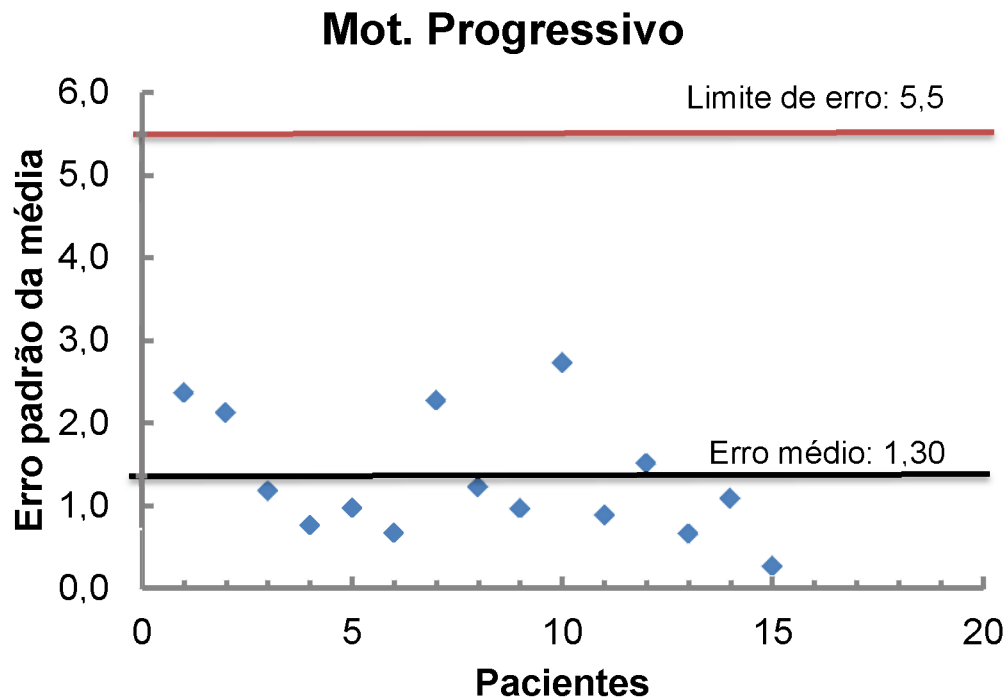


FIGURA 15 – ERROS PADRÃO MÉDIOS DA ANÁLISE DE MOTILIDADE PROGRESSIVA DOS ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

NOTA: n = 15, com 4 a 6 contagens para cada amostra, totalizando 69 contagens.

Mot. Não progressivo

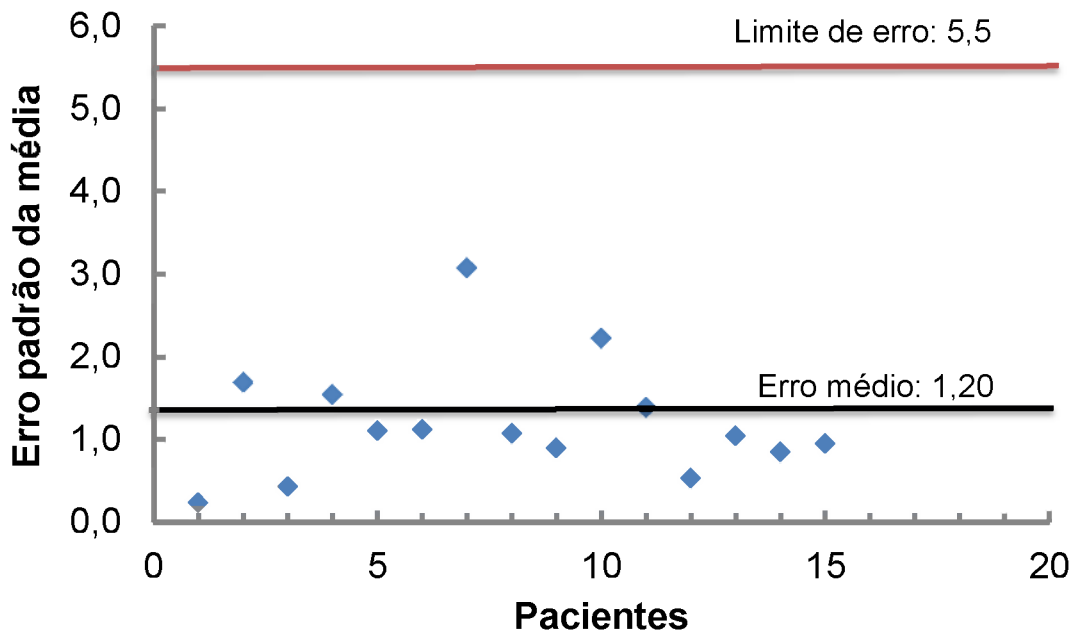


FIGURA 16 – ERROS PADRAO MEDIOS DA ANALISE DE MOTILIDADE NAO PROGRESSIVA DOS ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

NOTA: n = 15, com 4 a 6 contagens para cada amostra, totalizando 69 contagens.

Imóvel

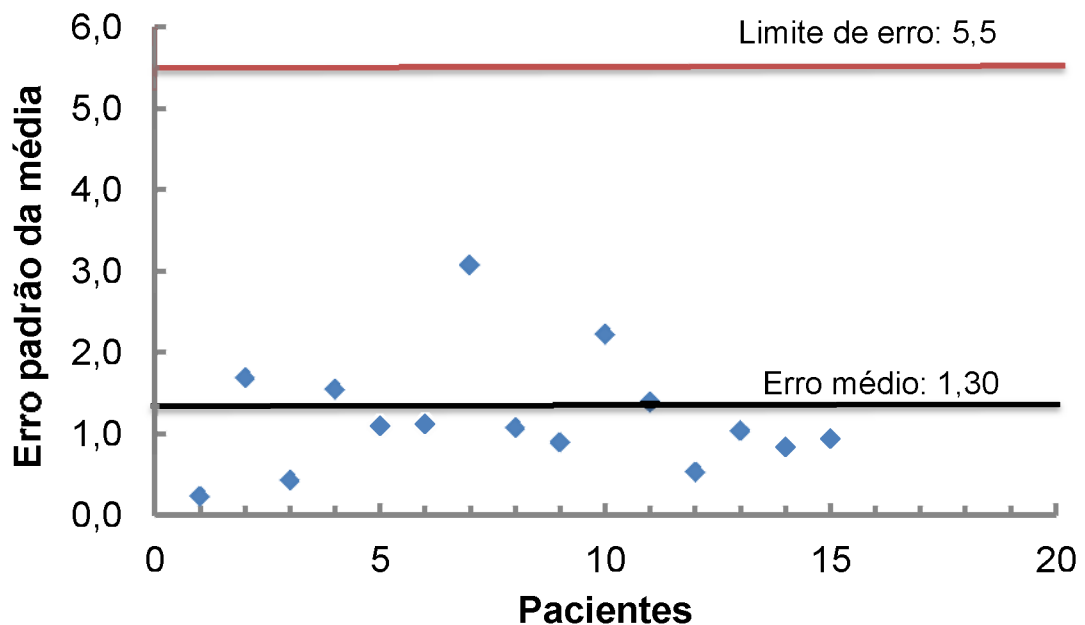


FIGURA 17 – ERROS PADRÃO MÉDIOS DA ANÁLISE DE ESPERMATOZOIDES IMÓVEIS, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

NOTA: n = 15, com 4 a 6 contagens para cada amostra, totalizando 69 contagens.

As médias, desvios padrão e coeficientes de variação obtidos para cada amostra estão representados na Tabela 3. Os resultados apresentam boa reprodutibilidade, com coeficientes de variação médios de 11,6 %, 18,3 % e 5,6 % para espermatozoides com motilidade progressiva, não progressiva e imóveis, respectivamente.

TABELA 3 – MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO PARA MOTILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

Paciente	Progressivo			Não progressivo			Imóvel		
	Média	Desvio padrão	CV (%)	Média	Desvio padrão	CV (%)	Média	Desvio padrão	CV (%)
1	60,4	5,8	9,6	6,7	0,6	8,3	33	6,3	19
2	41,4	4,7	11,5	7,2	3,8	52,1	51,4	4,4	8,6
3	15,3	2,6	17,1	8,6	1	11,1	76,1	2,2	2,9
4	23,5	1,7	7,2	23	3,4	15	53,5	2,4	4,6
5	60,8	2,2	3,6	13,9	2,5	17,7	25,4	1,6	6,4
6	32,7	1,5	4,5	13,3	2,5	18,8	54	1,8	3,3
7	15,1	5,1	33,6	21,9	6,9	31,4	62,9	3,9	6,2
8	11,7	2,7	23,4	15,6	2,4	15,4	72,7	4,1	5,7
9	33,6	1,9	5,8	21,1	1,8	8,5	45,4	1,4	3,1
10	49,2	5,5	11,1	17,7	4,4	25,1	33,2	1,3	3,9
11	35,3	1,8	5	17,6	2,8	15,7	47,1	2,1	4,6
12	11,2	3	27,1	5,3	1,1	19,8	83,5	3,8	4,5
13	22,8	1,3	5,8	19,6	2,1	10,6	57,6	3,3	5,7
14	50,9	2,2	4,3	15,2	1,7	11,1	34	0,9	2,8
15	13,2	0,5	4,1	13,9	1,9	13,6	72,9	1,7	2,3
Média*	32,3	2,8	11,6	14,5	2,6	18,3	53,2	2,8	5,6

NOTAS: n = 15, com 4 a 6 contagens para cada amostra, totalizando 69 contagens; *médias das médias, desvios padrão e coeficientes de variação encontrados.

5.2 CONCENTRAÇÃO

Para os cálculos de concentração espermática foram analisadas 35 amostras no total e realizadas de 2 a 5 contagens para cada técnica ou diluição. As diluições foram feitas de acordo com a necessidade de cada amostra, como mostra o Quadro 3. A variabilidade biológica pode ser observada na Tabela 4.

TABELA 4 – MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO DOS VALORES RELATIVOS PARA CONCENTRAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

Contagem	Diluição*	Média	Desvio padrão	CV (%)
por ml ($\times 10^6$)*	Neu gr 1 ^a	74,5	92,3	123,9
	Neu gr 2 ^a	71,2	76,3	107,1
	MK ^b	105,1	101,2	96,2
total ($\times 10^6$)*	Neu gr 1 ^a	220,5	241,1	109,4
	Neu gr 2 ^a	245,2	235,2	95,9
	MK ^b	333,5	238,5	71,5

NOTAS: n (gr 1) = 35, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 131 contagens; n (gr 2) = 19, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 78 contagens; n (Makler) = 16, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 59 contagens; gr 1 e gr 2 diluídos de acordo com o Quadro 3; *letras iguais indicam médias semelhantes; letras diferentes indicam diferenças entre as médias (Teste Mann-Whitney U); Neu gr 1 – Neubauer grupo 1; Neu gr 2 – Neubauer grupo 2; MK – Makler.

5.2.1 Câmara de Neubauer

A contagem em câmara de Neubauer foi realizada, quando possível, com 2 diluições distintas. A Figura 18 mostra a variabilidade biológica das amostras nos resultados por mililitro e total das contagens encontradas para as diferentes diluições.

As diferenças encontradas entre os valores obtidos com o emprego de diluições distintas não apresentaram significado estatístico, ou seja, o grau de diluição empregado parece não influenciar significativamente os resultados obtidos.

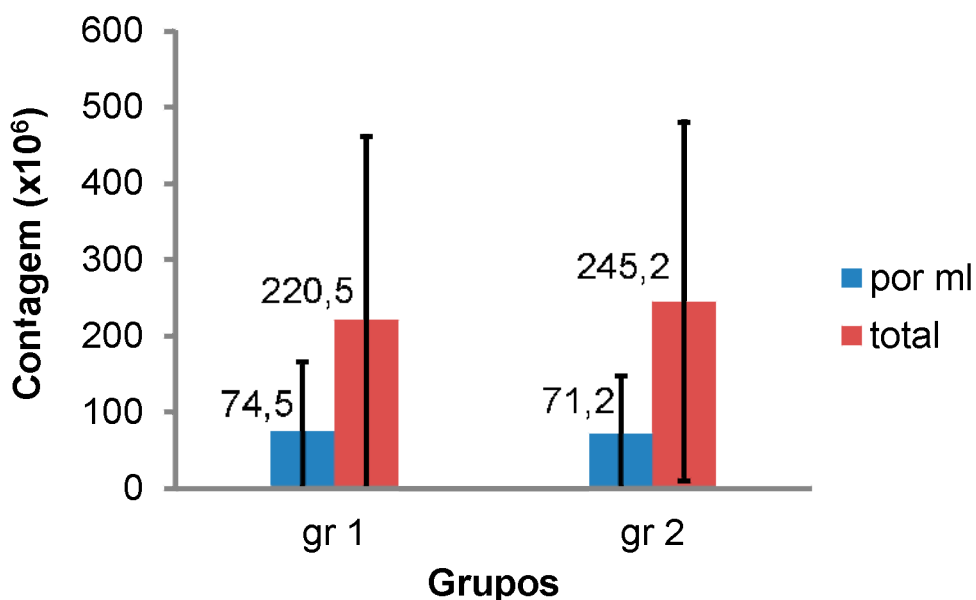


FIGURA 18 – VALORES MÉDIOS PARA CONTAGENS DE ESPERMATOZOIDES EM CÂMARA DE NEUBAUER, REALIZADAS EM DIFERENTES DILUIÇÕES DO LÍQUIDO SEMINAL, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

NOTAS: n (gr 1) = 35, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 131 contagens; n (gr 2) = 19, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 78 contagens; gr 1 e gr 2 diluídos de acordo com o Quadro 3; as barras de erro representam os desvios padrão; as amostras foram preparadas de acordo com a concentração aproximada percebida em preparações para análise da motilidade, como preconizado pelo manual *Who laboratory Manual for the examination and processing of human semen* da OMS.

As Tabelas 5 e 6 apresentam as médias das contagens encontradas por amostra e os valores mínimos e os máximos obtidos para as diluições 1 e 2, respectivamente. Mesmo alguns valores tendo aparecido fora do intervalo de confiança de 95 %, como foram realizadas de 2 a 5 contagens com cada amostra, o valor que difere dos outros poderia ser retirado.

TABELA 5 – MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE ESPERMATOZOIDES CONTADAS EM CÂMARA DE NEUBAUER PARA O GRUPO 1***, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

Paciente	Média (Min-Max)****	Paciente	Média (Min-Max)****	Paciente	Média (Min-Max)****
	Gr 1		Gr 1		Gr 1
1	261 (241-281)*	13	45,4 (43-49)**	25	177,25 (173-180)
2	669,5 (660-679)**	14	309,5 (294-329)	26	296,25 (278-313)*
3	333,5 (319-348)	15	132,75 (118-140)**	27	59 (55-63)**
4	335,5 (312-359)*	15	193,5 (172-215)*	28	130 (119-140)**
5	638 (610-673)**	17	73 (67-77)**	29	17 (15-19)**
6	402 (375-418)*	18	59,25 (58-60)**	30	15,75 (14-18)**
7	323 (320-326)	19	71,5 (65-78)**	31	175,25 (168-181)
8	382 (354-409)*	20	85,25 (84-86)**	32	254 (250-258)*
9	533,2 (496-602)*	21	126,5 (124-130)**	33	72,5 (70-75)**
10	144 (136-154)	22	365,75 (361-371)	34	6 (5-7)**
11	362,5 (354-371)	23	310,5 (306-318)	35	61,75 (56-66)**
12	108,2 (97-120)**	24	627,75 (602-659)**		

NOTAS: n = 35, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 131 contagens; *valores fora do intervalo de confiança; **valores não contemplados pelo Manual; ***diluições do grupo 1 realizadas conforme Quadro 3; gr 1 – grupo 1; (Min-Max) – valores mínimos e máximos; ****espermatozoides/ml.

TABELA 6 – MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE ESPERMATOZOIDES CONTADAS EM CÂMARA DE NEUBAUER PARA O GRUPO 2***, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

Paciente	Média (Min-Max)****	Paciente	Média (Min-Max)****
	Gr 2		Gr 2
1	289,2 (253-324)*	11	268,75 (263-276)
2	692,5 (657-721)**	12	284 (265-321)*
3	117 (108-124)**	13	139,75 (128-155)**
4	209,25 (191-226)*	14	99,5 (96-103)**
5	299 (291-317)	15	216,5 (202-237)
6	139,25 (132-146)**	16	239,5 (230-250)
7	198,25 (190-210)	17	130 (128-133)**
8	277,75 (270-286)	18	205,25 (194-217)
9	149,25 (148-152)	19	81,5 (76-91)**
10	536 (527-555)		

NOTAS: n = 19, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 78 contagens; *valores fora do intervalo de confiança; **valores não contemplados pelo Manual; ***diluições do grupo 2 realizadas conforme Quadro 3; gr 2 – grupo 2; (Min-Max) – valores mínimos e máximos; ****espermatozoides/ml.

As Figuras 19 e 20 trazem as contagens por paciente em cada diluição e mostram os erros padrão médios obtidos com o emprego desta técnica. Cada ponto representa uma amostra. A maioria dos resultados das análises realizadas ficaram dentro do intervalo de confiança de 95 %, ou seja, na condição em que foi realizada, a reprodutibilidade da técnica é válida.

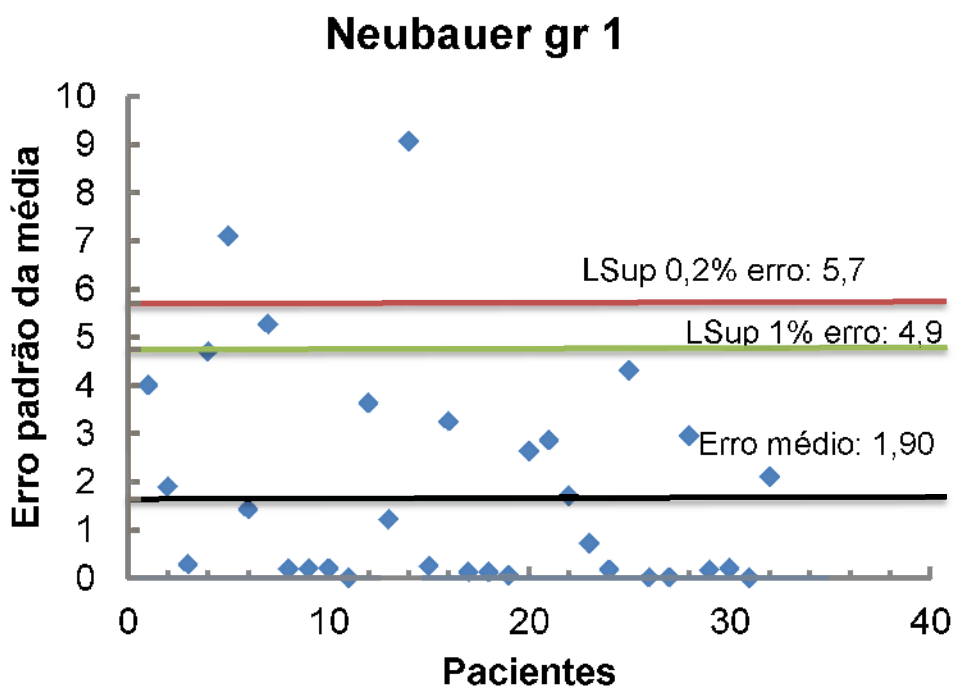


FIGURA 19 – ERROS PADRÃO MÉDIOS DA ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

NOTAS: n = 35, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 131 contagens; diluições do grupo 1 realizadas conforme Quadro 3.

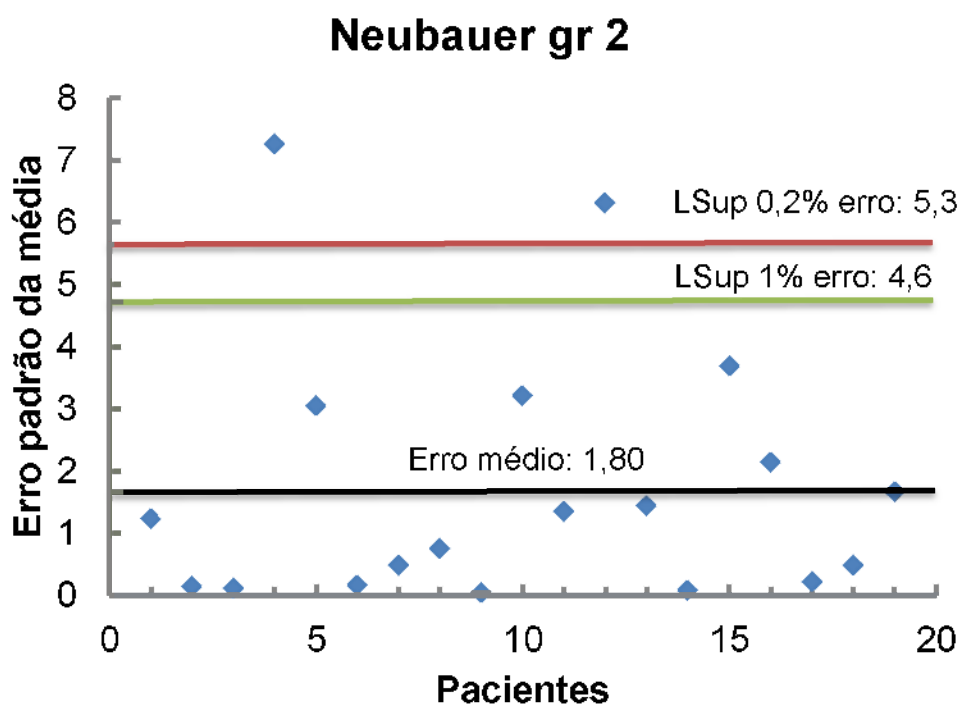


FIGURA 20 – ERROS PADRÃO MÉDIOS DA ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

NOTAS: n = 19, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 78 contagens; diluições do grupo 2 realizadas conforme Quadro 3.

As Tabelas 7 e 8 representam os desvios padrão e os coeficientes de variação por amostra para as diluições 1 e 2 nas contagens em câmara de Neubauer, respectivamente. Os resultados mostram-se com excelente reprodutibilidade, com um coeficientes de variação médios de 7,6 % e 3,6 % para diluições 1 e 2, por mililitro, respectivamente.

TABELA 7 – MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO PARA CONCENTRAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES CONTADOS EM CÂMARA DE NEUBAUER, NO GRUPO 1*, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

Paciente	Gr 1 (por ml**)			Gr 1 (total**)		
	Média	Desvio padrão	CV (%)	Média	Desvio padrão	CV (%)
1	52,2	5,7	10,8	203,6	22,1	10,8
2	133,9	2,7	2	535,6	10,7	2
3	6,7	0,4	6,1	16	1	6,1
4	67,1	6,6	9,9	402,6	39,9	9,9
5	319	15,9	5	638	31,7	5
6	80,4	3,2	4	128,6	5,1	4
7	0,6	0	1,3	1,3	0	1,3
8	191	11,8	6,2	382	23,5	6,2
9	5,3	0,4	7,8	20,8	1,6	7,8
10	7,2	0,4	5,8	30,2	1,8	5,8
11	3,6	0,1	3,2	21,8	0,7	3,2
12	5,4	0,4	8,2	26	2,1	8,2
13	0,2	0	6,7	0,3	0	6,7
14	129,6	56,6	43,7	462,3	178,7	38,7
15	64,2	84,3	131,2	243,8	248,5	101,9
16	193,5	18,1	9,4	619,2	58	9,4
17	7,3	0,5	6,7	29,2	2	6,7
18	0,2	0	2,5	0,5	0	2,5
19	17,9	20,8	116,4	NR	NR	NR
20	21,3	0,2	1,1	NR	NR	NR
21	63,3	1,3	2,1	NR	NR	NR
22	7,3	0,1	1,4	NR	NR	NR
23	310,5	5,3	1,7	621	10,5	1,7
24	125,6	5,7	4,6	602,6	27,5	4,6
25	177,3	3,4	1,9	354,5	6,8	1,9
26	29,6	1,4	4,9	88,9	4,3	4,9
27	5,9	0,3	5,7	23	1,3	5,7
28	130	8,6	6,6	390	25,8	6,6
29	0,2	0	10,7	0,6	0,1	10,7
30	0,2	0	10,8	0,9	0,1	10,8
31	175,3	5,9	3,4	613,4	20,7	3,4
32	25,4	0,3	1,3	127	1,7	1,3
33	14,5	0,4	2,9	63,8	1,8	2,9
34	0,1	0	13,6	0,1	0	13,6
35	61,8	4,2	6,8	123,5	8,4	6,8
Média***	69,5	7,6	13,3	218,4	23,8	10

NOTAS: n = 35, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 131 contagens; *diluições do grupo 1 realizadas conforme Quadro 3; **contagens por ml e total x 10⁶; ***médias das médias, desvios padrão e coeficientes de variação encontrados; por ml = espermatozoides/ml; total = espermatozoides no ejaculado; NR = não realizado.

TABELA 8 – MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO PARA CONCENTRAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES CONTADOS EM CÂMARA DE NEUBAUER, NO GRUPO 2*, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

Paciente	Gr 2 (por ml)			Gr 2 (total)		
	Média	Desvio padrão	CV (%)	Média	Desvio padrão	CV (%)
1	28,9	2,7	9,5	112,8	10,7	9,5
2	6,9	0,3	4,3	29,1	1,3	4,3
3	3,9	0,2	6,4	18,7	1,2	6,4
4	209,3	14,5	6,9	585,9	330,5	56,4
5	149,5	6,1	4,1	478,4	19,5	4,1
6	7	0,3	4,6	27,9	1,3	4,6
7	19,8	1	4,8	NR	NR	NR
8	55,6	1,5	2,7	NR	NR	NR
9	7,5	0,1	1,3	NR	NR	NR
10	268	6,4	2,4	536	12,8	2,4
11	134,4	2,7	2	645	12,9	2
12	142	12,6	8,9	284	25,2	8,9
13	28	2,9	10,3	83,9	8,6	10,3
14	5	0,2	3,1	19,4	0,6	3,1
15	108,3	7,4	6,8	324,8	22,1	6,8
16	119,8	4,3	3,6	419,1	15	3,6
17	26	0,4	1,7	130	2,2	1,7
18	20,5	1	4,7	90,3	4,3	4,7
19	40,8	3,3	8,2	81,5	6,7	8,2
Média***	72,7	3,6	5,1	241,7	29,7	8,6

NOTAS: n = 19, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 78 contagens; *diluições do grupo 2 realizadas conforme Quadro 3; **contagens por ml e total $\times 10^6$; ***médias das médias, desvios padrão e coeficientes de variação encontrados; NR = não realizado.

5.2.2 Câmara de Makler

Foram feitas contagens de espermatozoides em 16 amostras em câmara de Makler, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 59 contagens. A Tabela 9 mostra a média das contagens e os intervalos entre as diferentes contagens obtidas.

TABELA 9 – MÉDIAS DAS CONCENTRAÇÕES DE ESPERMATOZOIDES CONTADAS EM CÂMARA DE MAKLER, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

Paciente	Média (Min-Max)*	Paciente	Média (Min-Max)*
	Makler		Makler
1	162,4 (151-184)	9	74,3 (73-77)
2	125 (119-131)	10	191,8 (188-201)
3	81 (70-92)	11	224,8 (213-238)
4	45 (70-110)	12	38 (37-39)
5	76,3 (72-80)	13	56,5 (52-60)
6	64,7 (63-66)	14	128,8 (125-132)
7	34,3 (33-35)	15	172,5 (167-176)
8	72,5 (70-76)	16	229 (225-234)

NOTAS: n = 16, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 59 contagens; (Min-Max) – valores mínimos e máximos; *espermatozoides/ml.

A Figura 21 mostra os erros padrão médios obtidos com o emprego desta técnica. Os resultados da maioria das análises realizadas ficaram dentro do intervalo de confiança de 95 %, ou seja, na condição em que foi realizada, a reprodutibilidade da técnica é válida.

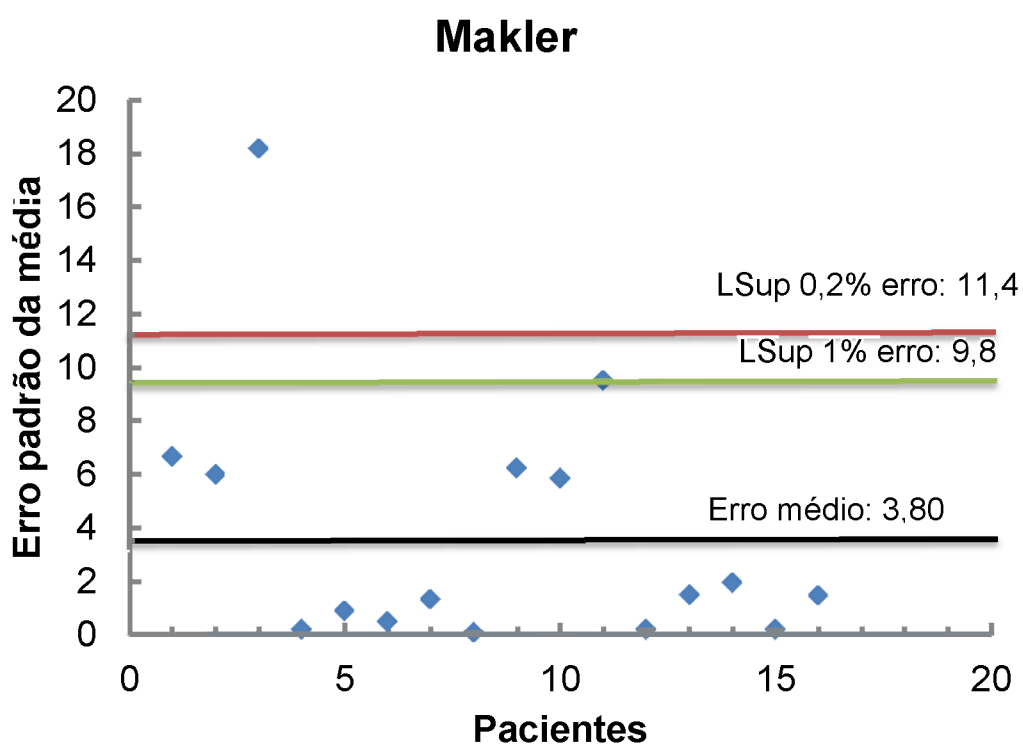


FIGURA 21 - ERROS PADRÃO MÉDIOS DA ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

NOTA: n = 16, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 59 contagens.

A Tabela 10 representa os desvios padrão e os coeficientes de variação por amostra nas contagens em câmara de Makler. Os resultados mostram-se com excelente reprodutibilidade, com coeficiente de variação médio de 9,6 % na contagem por mililitro.

TABELA 10 – MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO PARA CONCENTRAÇÃO DOS ESPERMATOZOÍDES CONTADOS EM CÂMARA DE MAKLER, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

Paciente	Makler (por ml)			Makler (total)		
	Média	Desvio padrão	CV (%)	Média	Desvio padrão	CV (%)
1	162,4	12,8	7,9	487,2	38,5	7,9
2	125	8,5	6,8	475	32,2	6,8
3	90	28,3	31,4	315	99	31,4
4	7,6	0,4	5,7	30,5	1,7	5,7
5	64,7	1,5	2,4	NR	NR	NR
6	34,3	1	2,8	NR	NR	NR
7	72,5	2,6	3,6	NR	NR	NR
8	7,4	0,2	2,5	NR	NR	NR
9	383,5	12,5	3,3	767	25	3,3
10	224,8	11,7	5,2	449,5	23,5	5,2
11	28,5	19	66,7	85,5	57,1	66,7
12	5,7	0,4	6,5	22	1,4	6,5
13	128,8	3	2,3	386,3	9	2,3
14	172,5	3,9	2,2	603,8	13,6	2,2
15	22,9	0,4	1,6	114,5	1,9	1,6
16	103	2,9	2,9	206	5,9	2,9
Média***	102,1	6,8	9,6	328,5	25,7	11,9

NOTAS: n = 16, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 59 contagens; **contagens por ml e total $\times 10^6$; ***médias das médias, desvios padrão e coeficientes de variação encontrados; NR = não realizado.

5.2.3 Neubauer vs Makler

As Figuras 22 e 23 mostram a comparação entre os valores por mililitro e total no ejaculado, do número de espermatozoides encontrado nas diferentes diluições em câmara de Neubauer e em câmara de Makler (sem diluição).

Os resultados obtidos mostram que a comparação entre as câmaras não é compatível, ou seja, as diferenças obtidas através de suas médias são estatisticamente significantes.

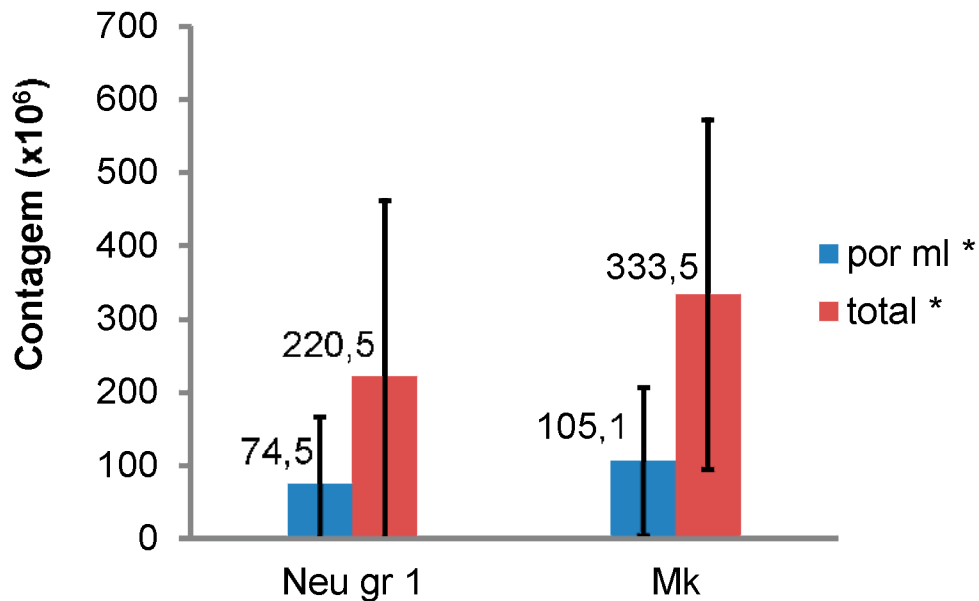


FIGURA 22 – VALORES MÉDIOS PARA CONTAGENS DE ESPERMATOZOIDES EM CÂMARA DE NEUBAUER, REALIZADAS EM DIFERENTES DILUIÇÕES DO LÍQUIDO SEMINAL E EM CÂMARA DE MAKLER, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

NOTAS: n (gr 1) = 35, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 131 contagens; n (Mk) = 16, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 59 contagens; gr 1 de acordo com o Quadro 3; as barras de erro representam os desvios padrão.

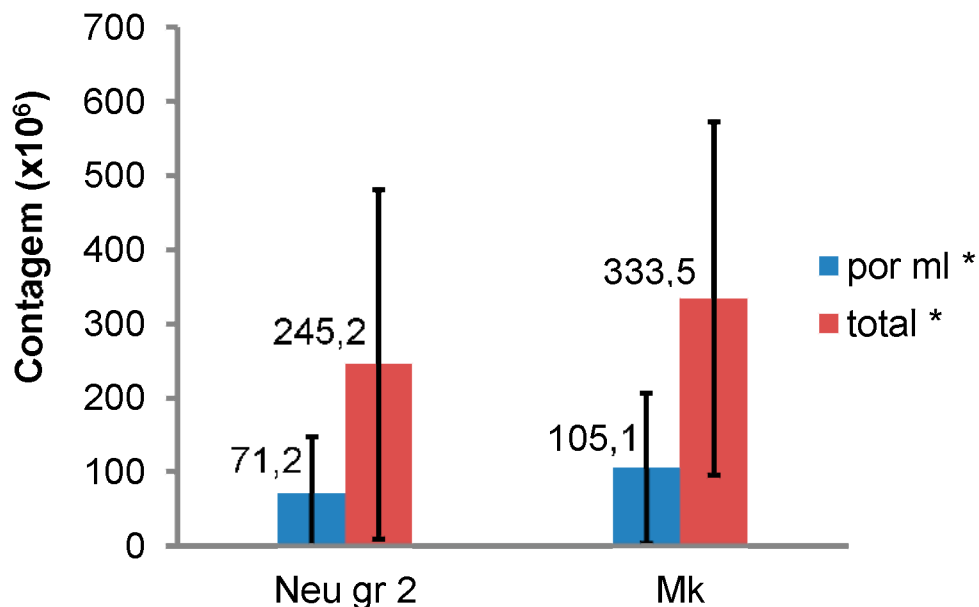


FIGURA 23 – VALORES MÉDIOS PARA CONTAGENS DE ESPERMATOZOIDES EM CÂMARA DE NEUBAUER, REALIZADAS EM DIFERENTES DILUIÇÕES DO LÍQUIDO SEMINAL E EM CÂMARA DE MAKLER, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

NOTAS: n (gr 2) = 19, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 78 contagens; n (Mk) = 16, com 2 a 5 contagens para cada amostra, totalizando 59 contagens; gr 2 de acordo com o Quadro 3; as barras de erro representam os desvios padrão.

5.3 MORFOLOGIA

Para a análise morfológica foram avaliadas 20 amostras, das quais foram feitas 2 a 4 lâminas de cada, totalizando 56 lâminas. A variabilidade biológica e frequência encontradas estão apresentadas nas Tabela 11 e 12, e na Figura 24.

TABELA 11 – MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO DOS VALORES RELATIVOS PARA MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZÓIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

Morfologia	Média (%)	Desvio padrão	CV (%)
Forma normal	4,96	2,64	53,11
Formas anormais	95,04	2,64	2,77

NOTA: n = 15, com 4 a 6 contagens para cada amostra, totalizando 69 contagens.

TABELA 12 – FREQUÊNCIAS DA MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZÓIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

Morfologia	Forma normal	Formas anormais	Cabeça*	Pescoço*	Cauda*
Frequência (%)	4,5	95,5	77,8	11,3	10,9

NOTAS: n = 20, com 2 a 4 contagens para cada amostra, totalizando 56 contagens; *formas anormais: alterações de cabeça, pescoço ou cauda.

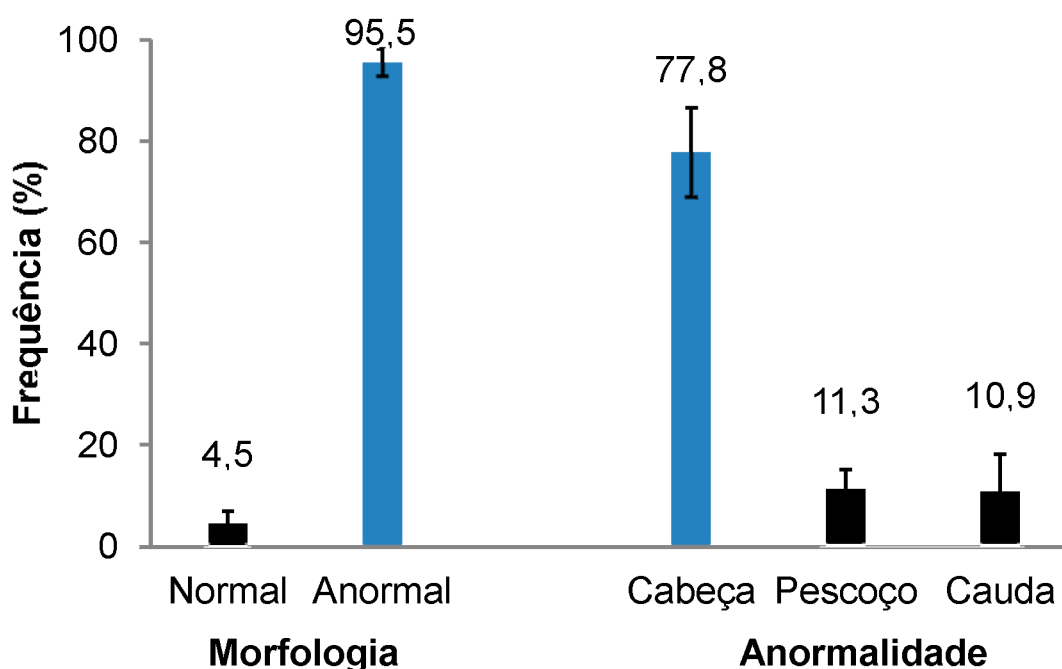


FIGURA 24 – FREQUÊNCIAS DA MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZÓIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

NOTAS: n = 20, com 2 a 4 contagens para cada amostra, totalizando 56 contagens; as barras de erro representam o desvio padrão.

A Tabela 13 mostra a média das porcentagens da morfologia e os valores mínimos e máximos obtidos com as contagens.

TABELA 13 – MÉDIAS DAS PORCENTAGENS DE FORMAS NORMAL E ANORMAIS DE ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

Paciente	Média (Min-Max)*	Média (Min-Max)*
	Normal	Anormal
1	11,5 (9,31-14,35)	88,5 (85,65-90,69)
2	5,3 (4,65-5,88)	94,7 (94,12-95,35)
3	0,5 (0,00-0,98)	99,5 (99,02-100,00)
4	1,8 (1,47-1,99)	98,2 (98,01-98,53)
5	6,1 (5,42-6,83)	93,9 (93,17-94,58)
6	4,2 (3,98-4,46)	95,8 (95,54-96,02)
7	6,4 (5,91-6,83)	93,6 (93,17-94,09)
8	2,5 (2,39-2,6)	97,5 (97,4-97,61)
9	2,3 (2,3-2,38)	97,7 (97,62-97,7)
10	4,1 (3,83-4,27)	96 (95,73-96,17)
11	2,2 (1,87-2,61)	97,8 (97,39-98,13)
12	3,9 (3,85-3,96)	96,1 (96,04-96,15)
13	3,5 (3,32-3,69)	96,5 (96,31-96,68)
14	7,4 (6,50-8,53)	92,6 (91,47-93,50)
15	4,2 (3,94-4,41)	95,8 (95,59-96,06)
16	4,6 (4,00-4,93)	95,4 (95,07-96,00)
17	5,2 (5,15-5,19)	94,8 (94,81-94,85)
18	4,3 (3,98-4,46)	95,7 (95,54-96,02)
19	7,1 (6,37-7,92)	92,9 (92,08-93,63)
20	2,9 (2,88-2,91)	97,1 (97,09-97,12)

NOTAS: n = 20, com 2 a 4 contagens para cada amostra, totalizando 56 contagens; (Min-Max) – valores mínimos e máximos; *espermatozoides/ml.

As Figuras 25 e 26 trazem as contagens por paciente e mostram os erros padrão médios obtidos com o emprego desta técnica. Cada ponto representa uma amostra. As análises realizadas ficaram dentro do intervalo de confiança de 95 %, ou seja, na condição em que foi realizada, a reprodutibilidade da técnica é válida.

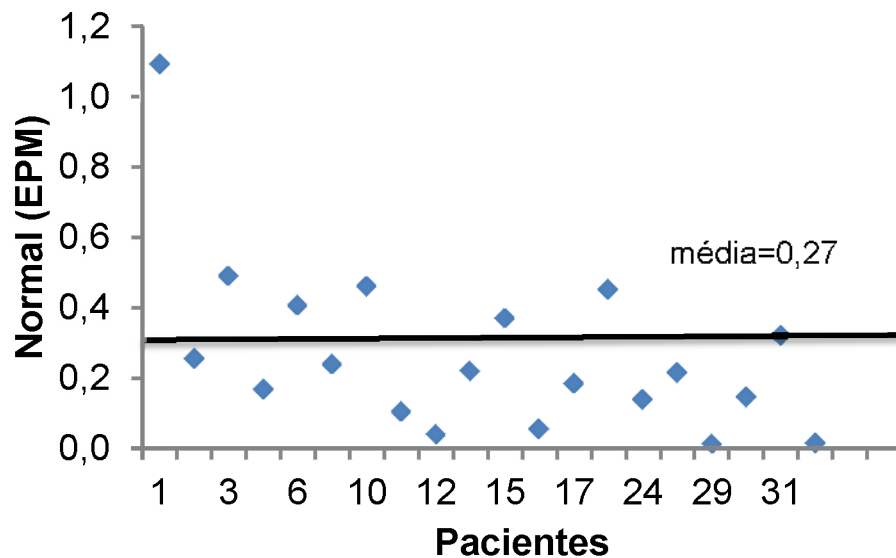


FIGURA 25 – ERROS PADRÃO MÉDIOS DOS RESULTADOS DA ANÁLISE DE MORFOLOGIA EM RELAÇÃO À FORMA NORMAL DE ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

NOTA: n = 20, com 2 a 4 contagens para cada amostra, totalizando 56 contagens.

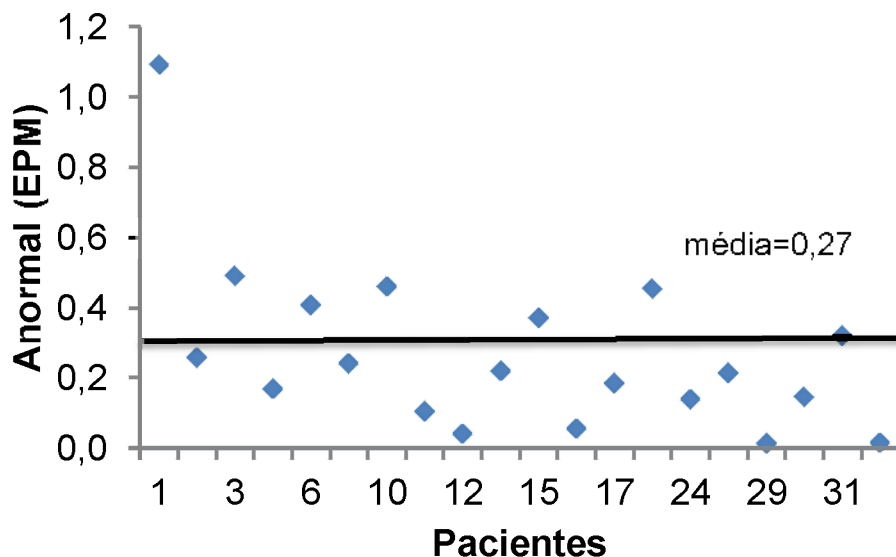


FIGURA 26 – ERROS PADRÃO MÉDIOS DOS RESULTADOS DA ANÁLISE DE MORFOLOGIA, EM RELAÇÃO ÀS FORMAS ANORMAIS DE ESPERMATOZOIDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

NOTA: n = 20, com 2 a 4 contagens para cada amostra, totalizando 56 contagens.

A Tabela 14 representa as médias, os desvios padrão e os coeficientes de variação por amostra para as análises de morfologia normal e anormal. Os resultados mostram-se com ótima reprodutibilidade, com coeficiente de variação médio de 8,8 % para formas normais.

TABELA 14 – MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTES DE VARIAÇÃO DOS VALORES RELATIVOS PARA MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZOÍDES, PACIENTES ATENDIDOS DE MARÇO A NOVEMBRO DE 2012, CLÍNICA ANDROLAB, CURITIBA-PR.

Paciente	Forma Normal			Formas Anormais		
	Média	Desvio padrão	CV (%)	Média	Desvio padrão	CV (%)
1	11,5	2,2	19,0	88,5	2,2	2,5
2	5,3	0,5	9,6	94,7	0,5	0,5
3	1,0			99,5	0,7	0,7
4	1,8	0,3	16,1	98,2	0,3	0,3
5	6,1	0,7	11,5	93,9	0,7	0,8
6	4,2	0,3	8,0	95,8	0,3	0,4
7	6,4	0,6	10,2	93,6	0,6	0,7
8	2,5	0,1	5,8	97,5	0,1	0,1
9	2,3	0,1	2,3	97,7	0,1	0,1
10	4,0	0,3	7,6	96,0	0,3	0,3
11	2,2	0,5	23,4	97,8	0,5	0,5
12	3,9	0,1	2,1	96,1	0,1	0,1
13	3,5	0,3	7,5	96,5	0,3	0,3
14	7,4	0,9	12,2	92,6	0,9	1,0
15	4,2	0,2	5,7	95,8	0,2	0,2
16	4,6	0,4	9,4	95,4	0,4	0,4
17	5,2	0,0	0,5	94,8	0,0	0,0
18	4,3	0,2	5,8	95,7	0,2	0,3
19	7,1	0,6	9,1	92,9	0,6	0,7
20	2,9	0,0	0,7	97,1	0,0	0,0
Média*	4,5	0,5	8,8	95,5	0,5	0,5

NOTAS: n = 20, com 2 a 4 contagens para cada amostra, totalizando 56 contagens; *médias das médias, desvios padrão e coeficientes de variação encontrados.

6 DISCUSSÃO

A fertilidade masculina está diretamente relacionada com a qualidade do sêmen, portanto, é de extrema importância estabelecer valores de referência para o espermograma. Porém, há variações nas metodologias empregadas, com diferentes valores de referência e subjetividade, o que pode gerar confusão e levar a condutas clínicas inadequadas (OMBELET *et al.*, 1997).

Apesar dos avanços propostos nos sucessivos manuais publicados pela Organização Mundial da Saúde, os métodos de análise seminal ainda não estão suficientemente padronizados (AUGER *et al.*, 2000), pois, não adianta apenas dizer que se utiliza o manual da OMS como referência, ele realmente deve ser utilizado para padronizar as técnicas e procedimentos dentro do laboratório de análises seminais. Muitos analistas acreditam que já utilizam a melhor técnica, permanecendo relutantes em alterar a metodologia empregada na direção de um consenso mundial (BRAZIL, 2010).

Apesar das definições e diretrizes existentes no Manual da OMS para análise do sêmen humano, 5ª edição, tanto o fato de as medições serem realizadas por seres humanos, como as próprias leis físicas que regem a variabilidade das medidas, implicam, invariavelmente, em erros. Além disso, as contagens são, geralmente, realizadas com uma pequena subpopulação de espermatozoides a partir das quais os resultados finais são matematicamente extrapolados (PACEY, 2010).

Vários autores discutem os valores de referência utilizados no novo Manual da OMS. Para MURRAY *et al.* (2012), o que parece ser uma mudança relativamente pequena pode vir a apresentar um grande impacto potencial. Nesse estudo, os autores mostram que 15 % dos pacientes que seriam considerados inférteis de acordo com os valores de referência apresentados no Manual da OMS para análise do sêmen humano, 1999, podem ser considerados férteis de acordo com o Manual da OMS para análise do sêmen humano, 5ª edição, argumentando que valores de referência mais baixos podem interferir nos tratamentos a serem seguidos. Entretanto, de acordo com GILBERT; COOPER; GOLDSTEIN (1992) e SAMPLASKI *et al.* (2010), o espermograma normal não garante que o homem esteja apto a se reproduzir e, para tanto, seriam necessárias outras análises, como as que avaliam a função espermática.

Para JOFFE (2010) e JEQUIER (2010), o Manual da OMS, em sua 5ª edição de 2010, trouxe contribuições positivas em relação às edições anteriores e a tendência deve ser a de melhorar cada vez mais nas próximas edições.

No presente trabalho demonstrou-se que, seguindo as técnicas propostas pelo Manual da OMS para análise do sêmen humano, 5ª edição, o estudo da reprodutibilidade apresentou variabilidade dentro dos limites definidos na replicação de análises em uma mesma amostra (Figuras 15, 16, 17, 19, 20, 21, 25 e 26). Quando o número de células contadas é baixo, aumenta o erro obtido e, consequentemente, aumenta o coeficiente de variação. Isto pode ocorrer dentro de uma mesma avaliação, por exemplo, muitos espermatozoides imóveis são contados enquanto o número de espermatozoides com motilidade não progressiva é consideravelmente menor.

Ao se comparar a reprodutibilidade obtida neste trabalho com a de estudos realizados sem o detalhamento da metodologia empregada, observa-se que há grande diferença entre os coeficientes de variação obtidos. Neste trabalho, os coeficientes médios obtidos para motilidade progressiva e concentração no grupo 1, por mililitro, foram de 11,6 % e 13,3 %, respectivamente. Já o trabalho de AUGER *et al.* (2000) apresentou um coeficiente de variação médio intraobservador de 26,2 % para motilidade e 15,8 % para concentração. Isto mostra a importância de laboratórios e técnicos aderirem ao Manual da OMS para análise do sêmen humano, 5ª edição, na busca de menores variações intra e interlaboratoriais, para as análises de motilidade, concentração e morfologia.

Na comparação do emprego de câmaras de Neubauer e de Makler para contagem de espermatozoides, os trabalhos apresentam resultados discordantes. No presente trabalho, os resultados apresentaram diferenças estatisticamente significativas ao se comparar o emprego dos dois tipos de câmara de contagem.

No trabalho de MAHMOUD *et al.* (1997), testou-se diversas variáveis na contagem de espermatozoides, sem diferenças significativas entre os resultados obtidos para as câmaras de Neubauer e de Makler. No entanto, os autores recomendam o uso da câmara de Neubauer, cujos resultados apresentaram melhor reprodutibilidade, com coeficientes de variação menores em relação aos obtidos a câmara de Makler, 7,1 % e 26,3 %, respectivamente.

O estudo de MATSON *et al.* (1999) revelou que, no caso do emprego da câmara de Makler, a demora na colocação da lamínula leva a uma contagem

superestimada dos espermatozoides. Quando a lamínula foi colocada imediatamente após a pipetagem, as contagens obtidas, quando comparadas às obtidas com a câmara de Neubauer, foram similares. No entanto, quando se passaram alguns segundos até a colocação da lamínula, houve sedimentação dos espermatozoides e, ao se colocar a lamínula, apenas o líquido seminal se espalhou, obtendo-se valores mais elevados para a concentração de espermatozoides. Estes achados poderiam justificar o fato de alguns autores encontrarem valores similares para as duas câmaras e outros acharem valores discrepantes, como é o caso do presente trabalho.

O estudo realizado por IMADE *et al.* (1993) comparou resultados obtidos para a contagem de espermatozoides com o uso das câmaras de Neubauer, de Makler e de Horwells, com diferenças estatisticamente significantes, com valores de $78,6 \pm 10,1$, $119,1 \pm 14,1$ e $211,5 \pm 27,5$ milhões/ml, e coeficientes de variação de 9,6, 5,9 e 7,1 %, respectivamente. Para os autores, as contagens feitas com a câmara de Neubauer foram subestimadas e as feitas com a câmara de Horwells foram superestimadas, sendo a de Makler a mais acurada. No presente trabalho, as contagens com a câmara de Makler também foram maiores que as obtidas com a câmara de Neubauer.

No estudo realizado por CARDONA-MAYA; BERDUGO; CADAVID (2008) utilizou-se as câmaras de Neubauer e de Makler, obtendo-se valores médios de $107,8 \pm 73,64$ e $106,2 \pm 74,24$ milhões/ml de espermatozoides, respectivamente, sem diferenças estatisticamente significantes. Estes resultados estão em desacordo com o presente trabalho.

A morfologia espermática pode levar a muitos erros, uma vez que formas *border-line* devem ser consideradas anormais. Talvez este seja um dos motivos que levem a grande diversidade de resultados. Neste trabalho, seguindo as instruções do Manual da OMS para análise do sêmen humano, 5ª edição, as contagens obtidas foram concordantes, sem diferenças estatisticamente significantes, em relação à variabilidade citada no Manual da OMS (WHO, 2010).

Em diversos estudos sobre o controle de qualidade das determinações do espermograma, demonstrou-se diferenças significantes no percentual de espermatozoides com forma normal, quando se comparou os resultados obtidos por diferentes analistas e diferentes laboratórios. Vários fatores podem ser responsáveis

por estas diferenças, como metodologia e interpretação diferentes e critérios de classificação distintos (DAVIS; GRAVANCE, 1994).

MENKVELD (2010) sugere que programas de controle de qualidade externos internacionais possam atuar juntos em relação à análise da morfologia espermática, unindo dados obtidos em diferentes levantamentos de controle de qualidade, para que se possa formar um padrão de avaliação de morfologia, para melhores formas de interpretação, uma vez que esta é uma análise subjetiva.

Para se obter acurácia nos resultados das análises seminais, é imprescindível que se use metodologia adequada (ANDRADE-ROCHA, 2003). Apesar da recomendação de padronização da metodologia empregada na análise do líquido seminal pela OMS, muitos trabalhos ainda apontam para a grande variabilidade de resultados (AUGER *et al.*, 2000; PALACIOS *et al.*, 2012; FILIMBERTI *et al.*, 2013).

A importância da padronização de métodos de análise entre os laboratórios é grande, como já citado, principalmente para obter resultados compatíveis entre si e também evitar erros de conduta quando há necessidade de buscar outro laboratório. O estudo realizado por AUGER *et al.* (2000) analisou a variabilidade interobservadores e interlaboratórios. Doze operadores avaliaram 17 amostras e os resultados obtidos demonstraram que as diferentes metodologias empregadas e a pouca prática de alguns dos participantes foram pontos decisivos para as diferenças nos resultados encontrados.

No trabalho de BJÖRNDahl *et al.* (2002) realizou-se um treinamento, para avaliar seu efeito imediato sobre as análises do líquido seminal realizadas por diferentes observadores e padronizou-se o uso do Manual WHO vigente na época (1992) e os resultados obtidos comprovaram uma substancial redução na variabilidade interobservadores em todos os aspectos da análise do sêmen.

Outra indicação de que o treinamento e a padronização são eficientes foi o trabalho de IWAMOTO *et al.* (2012) realizado no Japão, para avaliar a qualidade do sêmen. Para este estudo, foi utilizada a metodologia preconizada no Manual WHO, 2010. O trabalho foi feito em quatro localidades, precedido de treinamento do pessoal responsável pelos procedimentos em cada cidade. Como resultado, o controle de qualidade externo não mostrou diferenças interlaboratoriais maiores do que as recomendadas. Portanto, não foi necessário fazer correções para poder

comparar os resultados, que apontam para a importância da padronização dos procedimentos.

Após um período de treinamento, as análises deste trabalho foram realizadas e os resultados obtidos comprovaram boa reprodutibilidade das técnicas. É importante, assim, extrapolar este resultado para outros laboratórios. Desta forma, propomos um roteiro de Procedimentos Operacionais Padrão (POP) (Anexo IV) para coleta, preparo de amostras e determinações do espermograma, com base nas recomendações do Manual da OMS (WHO, 2010), a ser divulgado e disponibilizado a laboratórios de análises clínicas e laboratórios especializados em análises do líquido seminal. Conforme comprovado pelo trabalho de BJÖRND AHL *et al.* (2002), o treinamento pode ter um efeito imediato sobre a concordância de resultados entre diferentes observadores e laboratórios, diminuindo assim a variabilidade. A divulgação do citado roteiro poderá ampliar as oportunidades de conhecimento a respeito dos princípios e técnicas do Manual da OMS para análise do sêmen humano, 5ª edição, traduzidos de forma simplificada e objetiva, o que poderá contribuir para a diminuição dos erros e da variabilidade nas análises seminais.

7 CONCLUSÃO

O estudo da variabilidade de motilidade, concentração e morfologia de espermatozoides, realizado no líquido seminal de 37 pacientes da Clínica Androlab, Curitiba-PR, de março a novembro de 2012, permite concluir que:

- A metodologia preconizada pelo Manual da OMS para análise do sêmen humano, 5ª edição, para análises seminais de motilidade, concentração e morfologia de espermatozoides é simples, acessível e adequada para se obter resultados confiáveis e reprodutíveis;
- Os resultados obtidos neste trabalho para motilidade mostraram coeficientes de variação médios de 11,6 %, 18,3 % e 5,6 %; e erros padrão da média de 1,30, 1,20 e 1,30, respectivamente para motilidade progressiva, motilidade não progressiva e imóvel;
- Os resultados obtidos neste trabalho para concentração mostraram coeficientes de variação médios de 13,3 %, 5,1 % e 9,6 %; e erros padrão da média de 1,90, 1,80 e 3,80, respectivamente para câmara de Neubauer grupo 1, câmara de Neubauer grupo 2 e câmara de Makler, nas contagens por mililitro;
- Os resultados obtidos neste trabalho para morfologia mostraram coeficientes de variação médios de 8,8 % e 0,5 %; e erros padrão da média de 0,27 e 0,27, respectivamente para morfologia normal e anormal;
- Os valores dos coeficientes de variação e erros padrão da média permaneceram dentro dos limites recomendados no Manual da OMS (WHO, 2010), e, considerando-se a subjetividade inerente a técnicas baseadas em contagens de células e avaliações morfológicas, a variabilidade obtida foi aceitável;
- A importância do rigor técnico na coleta, preparo e processamento das análises do líquido seminal é ainda mais crítica em situações de anormalidade, quando os valores do espermograma podem ser determinantes para as condutas a serem tomadas;
- Com base no Manual da OMS para análise do sêmen humano, 5ª edição, na importância de se estabelecer consensos mundiais para a

redução da variabilidade interlaboratorial e nos resultados obtidos neste trabalho, torna-se relevante o estabelecimento de Procedimentos Operacionais Padrão simplificados para proporcionar aos laboratórios maior acessibilidade de padronizar as análises do líquido seminal, conforme o Protocolo: Procedimentos Operacionais Padrão para o Espermograma de acordo com a Metodologia preconizada pela Organização Mundial da Saúde.

REFERÊNCIAS

- AIRES, M. M. *et al.* **Fisiologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 68.
- ANDRADE-ROCHA, F. T. Semen analysis in laboratory practice: an overview of routine tests. **J. Clin. Lab. Anal.**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 6, p. 247-258, 2003. Disponível em: <http://www.barbiotech.it/didattica/magistrale/II/endocrinologia/gona_demaschile.pdf>. Acesso em: Mai/2011.
- ANDRADE-ROCHA, F. T. O exame do sêmen na infertilidade masculina: V – Exame Microbiológico. **RBAC**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, p. 49-56, 2008. Disponível em: <http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac_40_01/10.pdf>. Acesso em: Mai/2011.
- ANDROLAB – ANDROLAB REPRODUÇÃO HUMANA. Exames. Disponível em: <<http://www.androlab.com.br/?system=news&action=read&id=111>>. Acesso em: Set/2012.
- AUGER, J.; EUSTACHE, F.; DUCOT, B.; BLANDIN, T.; DAUDIN, M.; DIAZ, I.; MATRIBI, S. E. I.; GONY, B.; KESKES, L.; KOLBEZEN, M.; LAMARTE, A.; LORNAGE, J.; NOMAL, N.; PITAVAL, G.; SIMON, O.; VIRANT-KLUN, I.; SPIRA, A.; JOUANNET, P. Intra and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. **Hum Reprod**, England, v. 15, n. 11, p. 2360-2368, 2000. Disponível em: <<http://humrep.oxfordjournals.org/content/15/11/2360.full.pdf+html>>. Acesso em: Fev/2013.
- AYALA, C.; STEINBERGER, E.; SMITH, D. P. The influence of semen analysis parameters on the fertility potential of infertile couples. **J Androl**, USA, v. 17, n. 6, p. 718-725, 1996. Disponível em: <<http://www.andrologyjournal.org/cgi/reprint/17/6/718>>. Acesso em: Mai/2011.
- BEHRING – LABORATÓRIO BEHRING. **Exames**. Disponível em: <http://laboratorio.behring.com.br/lista_exames/index/E>. Acesso em: Set/2012.
- BERNE, R.; LEVY, M. **Berne & Levy: Fisiologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. cap. 43.
- BIOANÁLISE – LABORATÓRIO BIOANÁLISE. **Manual de exames**. Disponível em: <<http://www.laboratoriobioanalise.com.br/php/manual/manual.pdf>>. Acesso em: Set/2012.
- BIOLIDER – BIOLIDER MEDICINA DIAGNÓSTICA. **Espermograma**. Disponível em: <http://www.laboratoriobiolider.com.br/media/images/00003037_ESPERMOGRAMA.pdf>. Acesso em: Set/2012.
- BJÖRNDAHL, L.; BARRATT, C. L. R.; FRASER, L. R.; KVIST, U.; MORTIMER, D. ESHRE basic semen analysis courses 1995-1999: immediate beneficial effects of standardized training. **Hum Reprod**, England, v. 17, n. 5, p. 1299-1305, 2002. Disponível em: <<http://humrep.oxfordjournals.org/content/17/5/1299.full.pdf+html?sid=7c5d7bb4-4e82-4c67-a4ce-e481b1fbef89>>. Acesso em: Fev/2013.

BRAZIL, C. Practical semen analysis: from A to Z. **Asian J Androl**, China, v. 12, p. 14-20, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/aja/journal/v12/n1/pdf/aja200851a.pdf>>. Acesso em: Jan/2013.

CARDONA-MAYA, W.; BERDUGO, J.; CADAVID, A. Comparación de lá concentración espermática usando la câmara de Makler y la câmara de Neubauer. **Actas Urol Esp.**, Colombia, v. 32, n. 4, p. 443-445, 2008. Disponível em: <<http://scielo.isciii.es/pdf/aue/v32n4/v32n4a10.pdf>>. Acesso em: Mai/2011.

CASTRO, S. V. **Anatomia Fundamental**. 3ª ed. São Paulo: Makron Books, 1985. p 528-543.

CHRISTENSEN, P.; STRYHN, H.; HANSEN, C. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. **Theriogenology**, Denmark, v. 63, n. 4, p. 992-1003, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X04001852>>. Acesso em: Fev/2012.

DAVIS, R. O.; GRAVANCE, C. G. Consistency of Sperm Morphology Classification Methods. **J Androl**, USA, v. 15, n. 1, p. 83-91, 1994. Disponível em: <<http://www.andrologyjournal.org/cgi/reprint/15/1/83>>. Acesso em: Mai/2011.

ELIASSON, R. Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. **Asian J Androl**, China, v. 12, p. 26-32, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/aja/journal/v12/n1/pdf/aja200858a.pdf>>. Acesso em: Mai/2011.

FILIMBERTI, E.; DEGL'INNOCENTI, S.; BORSOTTI, M.; QUERCIOLO, M.; PIOMBONI, P.; NATALI, I.; FINO, M. G.; CAGLIERESI, C.; CRISCUOLI, L.; GANDINI, L.; BIGGERI, A.; MAGGI, M.; BALDI, E. High variability in results of semen analysis in Andrology Laboratories in Tuscany (Italy): the experience of an external quality control (EQC) programme. **Andrology**, Italy, 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2047-2927.2012.00042.x/pdf>>. Acesso em: Fev/2013.

FORD, W. C. L. Comments on the release of the 5th edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. **Asian J Androl**, China, v. 12, p. 59-63, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/aja/journal/v12/n1/pdf/aja200857a.pdf>>. Acesso em: Mai/2011.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Color textbook of Histology**. 3rd ed. USA: Saunders, 2007. cap. 21.

GILBERT, B. R.; COOPER, G. C.; GOLDSTEIN, M. Semen Analysis in the Evaluation of Male Factor Subfertility. **AUA**, USA, v. 11, p. 250-255, 1992. Disponível em: <http://www.brucegilbertmd.com/uploads/assets/Journal_Articles/BRGauasa.html>. Acesso em: Fev/2012.

GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil Medicine**. 23rd ed. USA: Saunders Elsevier, 2008. cap. 253.

GUNALP, S.; ONCULOGLU, C.; GURGAN, T.; KRUGER, T. F.; LOMBARD, C. J. A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in fertile population: an attempt to develop clinical thresholds. **Hum Reprod**, England, v. 16, n. 1, p. 110-114, 2001. Disponível em: <<http://humrep.oxfordjournals.org/content/16/1/110.full.pdf+html>>. Acesso em: Mai/2011.

GUYTON, A. C. **Fisiologia Humana**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 37.

GUZICK, D. S.; OVERSTREET, J. W.; FACTOR-LITVAK, P.; BRAZIL, C. K.; NAKAJIMA, S. T.; COUTIFARIS, C.; CARSON, S. A.; CISNEROS, P.; STEINKAMPF, M. P.; HILL, J. A.; XU, D.; VOGEL, D. L. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. **N Engl J Med**, Massachusetts, v. 345, n. 19, p. 1388-1393, 2001. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa003005>>. Acesso em: Mai/2011.

HERMES PARDINI. **Help de exames**. Disponível em: <<http://www.labhpardini.com.br/scripts/mgwms32.dll?MGWLPN=HPHOSTBS&App=HELPE&EXAME=ESP%7C%7CESPG>>. Acesso em: Set/2012.

HUMBERTO ABRÃO – HUMBERTO ABRÃO LABORATÓRIO. **Espermograma, estudo do líquido seminal, esperma funcional**. Disponível em: <http://www.humbertoabrao.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=43:espermograma-estudo-do-liquido-seminal-esperma-funcional&catid=9:ultimas-noticias&Itemid=9>. Acesso em: Set/2012.

IMADE, G. E.; TOWOBOLA, O. A.; SAGAY, A.S.; OTUBU, J.A. Discrepancies in sperm count using improved Neubauer, Makler, and Horwells counting chambers. **Arch Androl.**, UK, v. 31, n. 1, p. 17-22, 1993. Disponível em: <<http://196.46.147.196/bitstream/10485/1112/1/Discrepancies%20in%20Sperm%20Count%20Using%20Improved%20Neubauer,%20Makler,.pdf>>. Acesso em: Fev/2012.

IWAMOTO, T.; NOZAWA, S.; YOSHIIKE, M.; NAMIKI, M.; KOH, E.; KANAYA, J.; OKUYAMA, A.; MATSUMIYA, K.; TSUJIMURA, A.; KOMATSU, K.; TSUKAMOTO, T.; ITOH, N.; MIENO, M. N.; VIERULA, M.; TOPPARI, J.; SKAKKEBAEK, N. E.; JORGENSEN, N. Semen quality of fertile Japanese men: a cross-sectional population-based study of 792 men. **BMJ Open**, Japan, 2012. Disponível em: <<http://bmjopen.bmj.com/content/3/1/e002223.full.pdf+html>>. Acesso em: Fev/2013.

JANINI, J. B. M.; PEREIRA, O. S. **Atlas de morfologia espermática**. 1^a ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2001.

JAROW, J. P. Effects of varicocele on male fertility. **Hum Reprod Update**, England, v. 7, n. 1, p. 59-64, 2001. Disponível em: <<http://humupd.oxfordjournals.org/content/7/1/59.abstract>>. Acesso em: Set/2011.

JEQUIER, A. M. Semen analysis: a new manual and its application to the understanding of semen and its pathology. **Asian J Androl**, China, v. 12, p. 11-13, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/aja/journal/v12/n1/pdf/aja200912a.pdf>>. Acesso em: Fev/2013.

JIMENEZ, E. J. B.; *et al.*, **Planejamento familiar**. Curitiba: Secretaria Municipal da Saúde, 2005. Disponível em: <<http://sitesms.curitiba.pr.gov.br/saude/sms/protocolos/familiar.pdf>>. Acesso em: Set/2011.

JOFFE, M. Semen quality analysis and the idea of normal fertility. **Asian J Androl**, China, v. 12, p. 79-82, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/aja/journal/v12/n1/pdf/aja20093a.pdf>>. Acesso em: Jan/2013.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: texto/atlas**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. cap. 21.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histology and cell biology: an introduction to pathology**. 1st ed. USA: Mosby, 2002. cap. 20-21.

KJELDSBERG, C. R.; KNIGHT, J. A. Body Fluids: laboratory examination of amniotic, cerebrospinal, seminal, sorous, & synovial fluids: a textbook atlas. 3rd ed. Hong Kong: ASCP, 1993. cap.5.

KOSS, L. G.; MELAMED, M. R. **Koss' Diagnostic Cytology and its histopathologic bases**. 5th ed. USA: LWW, 2006. cap. 33.

LAMB, D. J. Semen analysis in 21st century medicine: the need for sperm function testing. **Asian J Androl**, China, v. 12, p. 64-70, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/aja/journal/v12/n1/pdf/aja20094a.pdf>>. Acesso em: Mai/2011.

MAHMOUD, A. M. A.; DEPOORTER, B.; PIENS, N.; COMHAIRE, F. H. The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. **Fert Steril**, USA, v. 68, n. 2, p. 340-345, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028297815269>>. Acesso em: Fev/2012.

MATSON, P.; IRVING, J.; ZUVELA, E.; HUGHES, R. Delay in the application of the cover glass is a potential source of error with the Makler Counting Chamber. **Fert Steril**, USA, v. 72, n. 3, p. 559-561, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028299002824>>. Acesso em: Fev/2012.

MENKVELD, R. Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. **Asian J Androl**, China, v. 12, p. 47-58, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/aja/journal/v12/n1/pdf/aja200914a.pdf>>. Acesso em: Mai/2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portal da Saúde**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/>>. Acesso em: Set/2011.

MORAES, G. E. S.; ÉBOLI, G. B.; PASQUALOTTO, F. F. **Espermocitologia: espermocitograma em critério estrito**. 2ª ed. Caxias do Sul, RS: Educs, 2007.

MURRAY, K. S.; JAMES, A.; MCGEADY, J. B.; REED, M. L.; KUANG, W. W.; NANGIA, A. K. The effect of the new 2010 World Health Organization criteria for semen analyses on male infertility. **Fert Steril**, USA, v. 98, n. 6, p. 1428-1431, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028212018833>>. Acesso em: Fev/2013.

NEWPROV – PRODUTOS PARA LABORATÓRIO. **Kit Papanicolaou**. Paraná, 2013. Disponível em: <<http://www.newprov.com.br/site/produtos.php>>. Acesso em: Jan/2013.

OMBELET, W.; BOSMANS, E.; JANSSEN, M.; COX, A.; VLASSELAER, J.; GYSELAERS, W.; VANDEPUT, H.; GIELEN, J.; POLLET, H.; MAES, M.; STEENO, O.; KRUGER, T. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. **Hum Reprod**, England, v. 12, n. 5, p. 987-993, 1997. Disponível em: <<http://humrep.oxfordjournals.org/content/12/5/987.long>>. Acesso em: Mai/2011.

PACEY, A. A. Is quality assurance in semen analysis still really necessary? A view from the andrology laboratory. **Hum Reprod**, England, v. 21, n. 5, p. 1105-1109, 2006. Disponível em: <<http://humrep.oxfordjournals.org/content/21/5/1105.full.pdf+html?sid=7c5d7bb4-4e82-4c67-a4ce-e481b1fbef89>>. Acesso em: Fev/2013.

PACEY, A. A. Quality assurance and quality control in the laboratory andrology. **Asian J Androl**, China, v. 12, p. 21-25, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/aja/journal/v12/n1/pdf/aja200916a.pdf>>. Acesso em: Fev/2013.

PALACIOS, E. R.; CLAVERO, A.; GONZALVO, M. C.; ROSALES, A.; MOZAS, J.; MARTÍNEZ, L.; RAMÍREZ, J. P.; BJÖRNDAHL, L.; MORANCHO-ZARAGOZA, J.; RENÁNDEZ-PARDO, E.; CASTILLA, J. A. Acceptable variability in external quality assessment programmes for basic semen analysis. **Hum Reprod**, England, v. 27, n. 2, p. 314-322, 2012. Disponível em: <<http://humrep.oxfordjournals.org/content/27/2/314.full.pdf+html>>. Acesso em: Fev/2013.

PASQUALOTTO, E. B.; FERREIRA, R. V.; FONSECA, G. P.; ZAGO, B. E.; GARBIN, C. J.; PASQUALOTTO, F. F. A análise seminal deve ser requisitada para homens com histórico de fertilidade prévia? **Ver Bras Ginecol Obstet**, Brasil, v. 28, n. 11, p. 652-657, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v28n11/a04v2811.pdf>>. Acesso em: Mai/2011.

SAMPLASKI, M. K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.; SABANEKH, E. New generation of diagnostic tests for infertility: Review of specialized semen tests. **Int J Urol**, Japan, v. 17, p. 839-847, 2010. Disponível em: <<http://www.clevelandclinic.org/reproductive/researchcenter/docs/agrado381.pdf>>. Acesso em: Mai/2011.

SÃO CAMILO – SÃO CAMILO MEDICINA DIAGNÓSTICA. **Espermograma**. Disponível em: <<http://www.gruposaoacamilo.com/apoio/uploads/downloads/0705172423.pdf>>. Acesso em: Set/2012.

SECCHI, C. Espermograma automatizado. **Publicações Weinmann**. Porto Alegre, 2005. Disponível em: <<http://www.publicacoesweinmann.com.br/2009/04/espermograma-automatizado.html>>. Acesso em: Fev/2013.

SEFI – SEFI-MEDICAL INSTRUMENTS. **Makler Counting Chamber**. Israel, 2013. Disponível em: <<http://www.sefimedical.com/makler1.htm>>. Acesso em: Mar/2013.

SEPAL – SEPAL REPRODUCTIVE INTERNATIONAL. **Makler Counting Chamber**. USA, 2013. Disponível em: <http://sepalreproductivedevices.com/template_products.cfm?classID=50>. Acesso em: Mar/2013.

SÉRGIO FRANCO – SÉRGIO FRANCO MEDICINA DIAGNÓSTICA. **Valores de referência**. Disponível em: <<http://www.sergiofranco.com.br/bioinforme/index.asp?cs=ValoresReferencia&ps=valoresReferencia>>. Acesso em: Set/2012.

SRIPADA, S.; TOWNEND, J.; CAMPBELL, D.; MURDOCH, L.; MATHERS, E.; BHATTACHARYA, S. Relationship between semen parameters and spontaneous pregnancy. **Fert Steril USA**, v. 94, n. 2, p. 624-630, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19361792>>. Acesso em: Mai/2011.

TIFFANY CHANG. Canada, 2013. <<http://moofysden.blogspot.ca>>.

UFPEL – UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS. **Testículo**. Disponível em: <www.google.com.br/url?sa=i&source=images&cd=&docid=yox_XNxOPE5U0M&tbid=BeZ74OI1RjzS7M:&ved=0CAgQjRwwAA&url=http://minerva.ufpel.edu.br/~mgrheing/cd_histologia/especial/testiculo.htm&ei=rLpCUZOmCejZ0QGmsYCwDg&psig=AFQjCNEBzf9JM33PPBOBBbHnfY6s6AuPvQ&ust=1363414060205704>. Acesso em: Fev/2013.

VASQUEZ R., F.; ECHEVERRI, D. V. Espermograma y su utilidad clínica. **Salud Uninorte**, Colômbia, v. 23, n. 2, p. 220-230, 2007. Disponível em: <http://ciruelo.uninorte.edu.co/pdf/salud_uninorte/23-2/8_Espermograma.pdf>. Acesso em: Mai/2011.

VAWDA, A. I.; GUNBY, J.; YOUNGLAI, E. V. Semen parameters as predictors of in-vitro fertilization: the importance of strict criteria sperm morphology. **Hum Reprod**, England, v. 11, n. 7, p. 1445-1450, 1996. Disponível em: <<http://humrep.oxfordjournals.org/content/11/7/1445.long>>. Acesso em: Mai/2011.

WALSH, T. J.; WU, A. K.; CROUGHAN, M. S.; TUREK, P. J. Differences in the clinical characteristics of primarily and secondarily infertile men with varicocele. **Fert Steril**, USA, v. 91, n. 3, p. 826-830, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2881683/?tool=pubmed>>. Acesso em: Set/2011.

WHITE, W. M.; *et al.*, Varicocele. **Medscape**, 2011. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/438591-overview>>. Acesso em: Set/2011.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction**. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. 5th ed. Switzerland: WHO Press, 2010. Disponível em <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf>. Acesso em: Mar/2011.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Infertility**. Disponível em: <<http://www.who.int/>>. Acesso em: Set/2011.

ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: “Controle de Qualidade de determinações de motilidade, concentração e morfologia de espermatozóides em líquido seminal”

Pesquisadora responsável: Ivi Cristina Rubim Duarte Lage – Aluna de Mestrado inscrita no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná.

Local da pesquisa: Laboratório de Citologia Clínica da UFPR e Androlab Clínica e Laboratório de Reprodução Humana e Andrologia.

Telefone para contato: (41) 3360-4088 /

E-mail: ivilage@gmail.com

Você está sendo convidado a participar do projeto intitulado “Controle de Qualidade de determinações de motilidade, concentração e morfologia de espermatozóides em líquido seminal”, sob a responsabilidade da pesquisadora Ivi Cristina Rubim Duarte Lage. É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços importantes em todas as áreas, e sua participação é fundamental.

O objetivo desta pesquisa é realizar estudos no sentido de controlar a qualidade dos métodos utilizados na análise do sêmen humano. Sua amostra não será utilizada para outras finalidades.

O benefício esperado com os resultados deste trabalho será a melhora no atendimento aos pacientes, em decorrência do aprimoramento dos métodos empregados na análise das amostras.

Caso você aceite participar, o material utilizado será o mesmo que for coletado para o seu exame na Androlab Clínica e Laboratório de Reprodução Humana e Andrologia, não sendo necessária nova amostra para a pesquisa.

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar ou retirar o seu consentimento sem penalização. Lembrando que não haverá nenhum custo ou benefício financeiro a você pela participação no estudo.

Responsáveis: _____/_____

Paciente: _____

Data: ____/____/20____

Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial e serão utilizados para a avaliação do estudo. As identidades serão substituídas por códigos mantendo a confidencialidade. Membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado, porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Em caso de dúvida com relação ao estudo, você poderá entrar em contato com a pesquisadora pelos telefones citados ou e-mail. Estão garantidas todas as informações que você queira, antes, durante ou depois do estudo.

Eu li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. Entendi que sou livre para aceitar ou recusar, e que posso interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Entendi que qualquer problema relacionado à pesquisa será tratado sem custos para mim. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

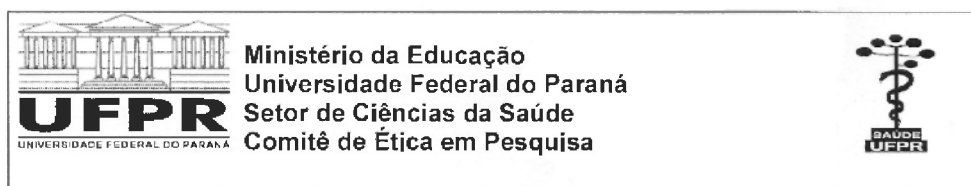
Nome do Paciente

Assinatura

Curitiba, ____/____/20__

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO II – PROTOCOLO CEP/SD



Curitiba, 08 de agosto de 2011

Ilmo (a) Sr. (a)
Ivi Cristina Rubim Duarte Lage
Maria Suely Soares Leonart
Aguinaldo José do Nascimento
Sandra Mara Stockler
Adriane Trovão Soares Pereira
Kahisa Natiele Fontana

Nesta

Prezados Pesquisadores,

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Controle de qualidade de determinações de motilidade, concentração e morfologia de espermatozoides em líquido seminal"**, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 03 de agosto de 2011.

Registro CEP/SD: 1176.101.11.08

CAAE: 0101.0.091.000-11

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do 1º relatório parcial: 03/02/2012

Atenciosamente

Prof.ª Dr.ª Cláudia Seely Rocco
 Coordenadora do Comitê de Ética em
 Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Prof.ª Dr.ª Cláudia Seely Rocco
 Coordenadora do Comitê de Ética

Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-Pr. – CEP: 80060-240
 Fone/fax: 41-360-7259 – e-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO III – NORMAS PARA COLETA DE ESPERMOGRAMA



ANDROLAB

CLÍNICA E LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO HUMANA E ANDROLOGIA

NORMAS PARA COLETA DE ESPERMOGRAMA

O Paciente deverá estar em abstinência sexual de 3 (três) à 5 (cinco) dias. Isto inclui não ter relação sexual, não se masturbar e não ter tido ejaculação em qualquer circunstância durante este período de tempo.

Coletar a amostra de preferência no próprio laboratório da ANDROLAB.

Se não for possível, a amostra deverá ser trazida ao mesmo, pelo próprio paciente dentro da **1ª (primeira) hora** após a coleta, mantendo-a junto ao corpo para que permaneça aquecida.

Lavar as mãos e os genitais, coletar o material por masturbação. É preciso que a excitação sexual conseguida seja intensa, Colhendo o esperma **diretamente em frasco estéril**. Não sendo permitido o uso de preservativo ou qualquer outro tipo de coletor.

O paciente não poderá estar fazendo o uso de pomadas ou cremes genitais.

Favor comunicar a recepcionista, responsável pelo laboratório ou médico quando o uso de medicações, uso de drogas ou episódios de febre alta recente.

Tomar cuidado para que **toda** a amostra seja recolhida.

Se houver alguma perda, **avisar** ao técnico do laboratório.

O resultado será entregue em 07 (sete) dias úteis após a entrega da amostra no laboratório.

HORÁRIO DE ENTREGA DO MATERIAL:

SEGUNDA À SEXTA-FEIRA DAS 08:00 ÀS 11:00 HORAS

HORÁRIO DE ENTREGA DO MATERIAL

FRAGMENTAÇÃO DE DNA

TERÇAS E QUINTAS-FEIRA DAS 08:00 ÀS 09:00 HORAS

**OBS: APÓS O HORÁRIO DETERMINADO ACIMA,
AS AMOSTRAS NÃO SERÃO ACEITAS**

Rua Bom Jesus, 758 - Juvevê - Curitiba - Paraná - Fone: 41 3352-2544 - Fax: 41 3253-7999
e-mail: androlab@androlab.com.br - home page: www.androlab.com.br

ANEXO IV – PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO PARA O ESPERMOGRAMA DE ACORDO COM A METODOLOGIA PRECONIZADA PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE

1. Procedimentos pré-analíticos:

- ✓ Período de abstinência: 2 a 7 dias. Recoleta – respeitar o mesmo período.
- ✓ Coletar o sêmen integralmente por masturbação.
- ✓ Frasco limpo, de vidro ou plástico não tóxico para os espermatozoides.
- ✓ Identificar: nome e código do paciente, idade, período de abstinência, dia e hora da coleta.
- ✓ A análise deve ser realizada assim que ocorrer sua liquefação.

2. Exames macroscópicos:

2.1. Liquefação

- ✓ Geralmente ocorre entre 15 a 30 min, em banho-maria a 37 °C.
- ✓ Caso não ocorra a liquefação após 60 min, relatar no laudo e agitar mecanicamente ou expor o material à bromelina na concentração de 10 UI/ml.

2.2. Viscosidade

- ✓ Aspirar por pipeta graduada com 1,5 mm de diâmetro e deixar o líquido seminal fluir.
- ✓ VR: pequenas gotas ou filetes com até de 2 cm de comprimento.

2.3. Aspecto

- ✓ Aparência homogênea, de opalescência acinzentada.

2.4. Volume

- ✓ Medido no próprio frasco de coleta, se graduado, ou aspirado em pipeta volumétrica.
- ✓ VR: mínimo 1,5 ml.

2.5. pH

- ✓ Medido preferencialmente 30 min após a coleta.
- ✓ Colocar 1 gota da amostra homogeneizada em fita de pH de intervalo 6,0 a 10,0.
- ✓ VR: min 7,2.

3. Exames microscópicos:

- ✓ Importante homogeneizar antes de cada pipetagem, mexendo gentilmente a amostra ou aspirando e soltando cuidadosamente, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, em ambos os casos, com muito cuidado para evitar a formação de bolhas.
- ✓ Montagem da lâmina microscópica: 10 µl de sêmen recobertos com lamínulas de 22x22 mm, o que confere uma espessura de 20 µm ao preparado, o observadas sob aumento de 200x ou 400x.

3.1. Aglutinação e agregação

- ✓ Agregação: adesão entre espermatozoides imóveis, ou entre espermatozoides móveis e muco, outras células e restos celulares.
- ✓ Aglutinação: adesão entre espermatozoides móveis pela cabeça, peça intermediária ou cauda. Sempre deve ser relatada:
 - Isolado = menos de 10 espermatozoides;
 - Moderado = 10 a 50 espermatozoides;
 - Acentuado = mais de 50 espermatozoides;
 - Grosseiro = todos os espermatozoides.

3.2. Motilidade

- ✓ Deve ser avaliada logo que ocorrer a liquefação.
- ✓ Escolha do campo randômica, evitando as bordas (5 mm).
- ✓ Contar todo espermatozoide que estiver no campo após a focalização e, por outro lado, os que entrarem depois, não.
- ✓ Primeiro contar os espermatozoides com motilidade progressiva, seguidos pelos de motilidade não progressiva e, finalmente, pelos imóveis.
 - Motilidade progressiva: espermatozoides que saem do lugar;

- Motilidade não progressiva: se movimentam, mas não saem do lugar;
- Imóveis: não apresentam movimento algum.
- ✓ VR: mínimo 40 % de motilidade total (progressiva e não progressiva) e 32 % de motilidade progressiva.

3.3. Vitalidade

- ✓ Montagem da lâmina: 5 µl de sêmen e 5 µl de eosina Y 0,5 % recobertos com lamínulas de 22x22 mm. Deixar repousar por 2 min antes da análise.
- ✓ Espermatozoides vivos não serão corados e os mortos serão corados em cor-de-rosa.
- ✓ VR: mínimo de 58 % de vivos.

3.4. Concentração

- ✓ Concentração de espermatozoides: número de espermatozoides por ml.
- ✓ Concentração total: número total no ejaculado.
- ✓ Para a contagem, deve-se fazer uma diluição de 1:2 a 1:20, de acordo com o número estimado de espermatozoides na amostra.
- ✓ Esta estimativa pode ser feita em uma lâmina simples, como a da motilidade, por exemplo, de acordo com o Quadro 1.

Spz por campo	Diluição	Sêmen (µl)	Diluyente (µl)	Número de campos*
> 101	01:20	50	950	4, 5 e 6
16 – 100	01:05	50	200	4, 5 e 6
2 – 15	01:02	50	50	4, 5 e 6
< 2	01:02	50	50	Todos

QUADRO 1: DILUIÇÃO NECESSÁRIA PARA CONTAGEM E CAMPOS DE LEITURA.

NOTA: *Campos da câmara de Neubauer; Spz = espermatozoide.

- ✓ Diluente: 50 g de bicarbonato de sódio, 10 ml de formalina a 35 % (v/v) e 0,25 g de azul de tripan ou 5 ml de violeta de genciana aquosa saturada com água destilada qsp 1000 ml.
- ✓ A contagem realizada em câmara de Neubauer, em seu retículo central para contagem de eritrócitos.
- ✓ Contar apenas espermatozoides inteiros (cabeça e cauda).
- ✓ Cálculo: $C = (N/n) \times (1/20) \times \text{fator de diluição}$, onde N é o número de espermatozoides contados e n é o número de linhas por campo (20 nl por cada campo). O resultado encontrado é spz/nl ou spz $\times 10^6$ /ml.
- ✓ VR: 15×10^6 /ml e de 39×10^6 no ejaculado.

3.5. Células redondas

- ✓ Contada em câmara de Neubauer, junto da contagem de espermatozoides.
- ✓ São, por exemplo, células epiteliais do trato uretral, células da espermatogênese e polimorfonucleares devem ser registrados.
- ✓ Sua concentração é determinada por contagem e cálculo em relação ao número de espermatozoides pela fórmula $C = S \times (N/400)$, onde: C = concentração de células redondas; S = concentração de espermatozoides; e N = número de células redondas contadas.
- ✓ Se baixa contagem (menos de 25 células), relatar que o número de células é insuficiente para cálculos.

3.6. Morfologia

- ✓ Montagem da lâmina: com uma gota do líquido seminal, deixando-a secar ao ar.
- ✓ A fixação do material na lâmina deve ser feita com etanol em diversas graduações.
- ✓ Coloração de Papanicolaou.
- ✓ Observar com objetiva de imersão (1000x). Após a montagem da lâmina espera-se aproximadamente 60 s para o material assentar e conta-se um mínimo de 200 espermatozoides por replicata, em pelo menos cinco campos microscópicos.

- ✓ Espermatozoides normais: cabeças ovais com 4 a 5,5 μm x 2,5 a 3,5 μm ; a região acrossômica compreende de 40 a 70 % da cabeça, sem defeitos no pescoço, peça intermediária ou cauda; e a gota citoplasmática não deve ser maior que 1/3 do tamanho da cabeça.
- ✓ VR: mínimo 4 % de morfologia normal.
- ✓ Defeitos:
 - Cabeça: grande, pequena, afilada, piriforme, *tapered* (alongada), redonda, amorfa, vacuolizada, dupla ou qualquer combinação;
 - Peça intermediária: amorfa, fina, grossa, longa, curta, excêntrica, implantada de forma angular;
 - Cauda: bicaudal, enrolada, grossa, fina, curta, longa, dobrada, quebrada, curva.